BIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE WIRKUNG VON ANDROST - 3 - EN - 17 - OL UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES WASSERSTOFF-TRANSFERS ZWISCHEN STEROIDEN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Stefan Goedecke
aus Solingen/Gräfrath

Berlin 1973

BIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE WIRKUNG VON ANDROST - 3 - EN - 17 - OL UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES WASSERSTOFF-TRANSFERS ZWISCHEN STEROIDEN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Stefan Goedecke
aus Solingen/Gräfrath

Berlin 1973

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Wenzel
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Möhrle

Tag der mündlichen Prüfung: 13.6.1973
Tag der Promotion: 13.6.1973

Die vorliegende Arbeit wurde in der Radioisotopenabteilung des Pharmazeutischen Instituts der Freien Universität Berlin unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Wenzel ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. M. Wenzel danke ich für die wertvollen Anregungen und das große Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte.

Mein Dank gilt der Fa. Schering AG, Berlin, für die Unterstützung bei den endokrinologischen Untersuchungen.

Ferner danke ich Fräulein I.H.Gatzke für ihre technische Hilfe.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552710_0094

INHALT

Seite

1. Einführung und Problemstellung 1

2. Literaturübersicht 4

3. Ergebnisse 12

3.1. Stoffwechsel von Androst-3-en-17ol und und dessen Beeinflussung durch Östron in Organen der Ratte

3.1.1. Die Tritium-Übertragung von 17aT-Androsten-17ol auf Östron in Leberhomogenat männlicher und weiblicher Ratten

a. Stoffwechsel von Androsten-17ol und Identifizierung der Metabolite

b. Einfluß der verschiedenen Parameter auf den Wasserstoff-Transfer

3.1.2. Organ- und Sexualspezifität 20

3.1.3. Substrat- und Coenzymspezifität 22

3.1.4. Beeinflussung der Oxidation von Androsten-17ol durch Östron und Östradiol in vitro und in vivo 26

3.2. Metabolismus und Biochemie von Androst-3-en-17ol im Uterus der Ratte 31

3.2.1. Gewebeaffinität in vitro und in vivo 33

3.2.2. In welcher chemischen Form liegt Androsten-17ol im Uterus vor? 35

3.2.3. Vergleich der Uterusaffinität verschiedener Steroide 37

3.2.4. Konzentrationsabhängigkeit des Tritium-Einbaus 38
3.2.5. Hemmung der Uterusbindung 40
3.3. Endokrinologische Wirkungen von Androst-3-en-17ol bei Ratten und Mäusen 45
3.3.1. Östrogene Wirkung
3.3.2. Antiöstrogene Wirkung 46
3.3.3. Androgene und anabole Wirkung 49

4. Diskussion 52

5. Abbildungen 70

6. Material und Methodik 95

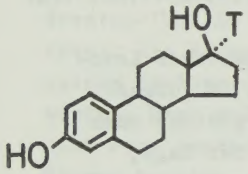
7. Zusammenfassung 112

8. Literatur 115

1. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

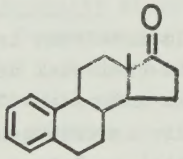
Von Wenzel und Mitarbeitern (Lit. 1,2,3,4,5) wurde eine enzymatische Wasserstoffübertragung von Östradiol auf verschiedene Ketosteroide beschrieben. Für die Reaktion macht man Dehydrogenasen oder Systeme verantwortlich, die bei der Oxidation von 17aT-Östradiol zu Östron ein T-Hydrid-Ion abspalten und zum Beispiel die Ketogruppen in Androsten-dion, Progesteron und Cortison reduzieren können.

Diese Reaktionen können allgemein folgendermaßen formuliert werden:



17aT-Östradiol

NAD
17ß-OH-Steroid-Dehydrogenase



+ NADT

Östron

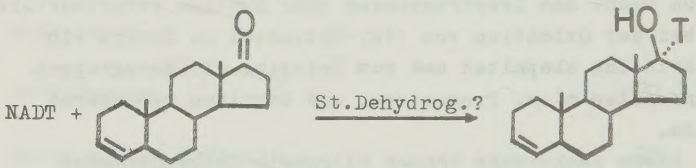
NADT + 17-Keto-Steroide / 20-Keto-Steroide —St.Dehydrog.?→ an C-17 / an C-20 -T-markierte Reduktionsprodukte

Der von einem Hydroxysteroid stammende Wasserstoff wird um den Faktor 10^3 bevorzugt zur Reduktion eines anderen Ketosteroids verwendet im Vergleich zu Wasserstoff, der von einem enzymatisch dehydrierbaren Nicht-Steroid stammt. Die im Lebergewebe befindlichen Nicht-Steroide (Laktat, Glycerophosphat, Glucose-6-phosphat), die in wesentlich größerer Konzentration vorliegen und ebenfalls enzymatisch dehydrierbar sind, sind offensichtlich

nicht so effektive Wasserstoff-Donatoren (Lit.1,60,83).

Wenzel und Mützel (Lit.4) fanden diesen Wasserstoff-Transfer zwischen Hydroxy- und Ketosteroiden auch bei solchen Steroiden, von denen keine biologische Wirkung bekannt war.

Die Reaktion mit einem solchen biologisch inaktiven Steroid läßt sich wie folgt darstellen:



5a-Androst-3-en-17-on 5a-Androst-3-en-17-ol-17aT

Im Endeffekt ist also ein biologisch inaktives Ketosteroid (Beispiel des 5a-Androst-3-en-17-on, im folgenden als Androsten-17on/-17ol bezeichnet. Vergleiche dazu auch die Anmerkungen in 6.1.3.,Material.)in der Lage, Östradiol zu Östron zu oxidieren. Diese Oxidation führt zu einem Abfall der östrogenen Wirkung, da Östron schwächer wirkt als Östradiol.

Bisher fehlte jedoch eine Untersuchung über den weiteren Weg des Wasserstoffs, der auf derartige Akzeptorsteroide übergegangen ist. Diese Arbeit soll den Stoffwechselweg des auf diese Weise entstandenen Steroids und damit des C_{17}-Wasserstoffs weiter aufklären helfen. Wird der Wasserstoff von dem Akzeptorsteroid weitergereicht auf erneut angebotene Steroide, oder verbleibt er beim einmal reduzierten Steroid?

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit soll untersucht werden, ob Androsten-17ol ebenfalls als Wasserstoff-Donator fungieren und Östron zu Östradiol reduzieren kann. Diese Versuche sollen in Analogie zu den von Wenzel et al. beschriebenen Arbeiten durchgeführt werden.

Um etwaige Geschlechtsspezifitäten dieser Reaktion nachzuweisen, soll mit den Stoffwechselorganen männlicher und weiblicher Ratten gearbeitet werden (Lit.6,7,8,9,10).

Interessant erscheint auch die Frage nach der Wirkung des Androsten-17ol auf das Erfolgsorgan des Östradiol, den Uterus. Nach Untersuchungen von Jensen (Lit.11) soll Östradiol im Uterus zwar an einen Rezeptor gebunden werden, aber dort nicht oxidiert werden. Nach den Befunden von Jütting (Lit.12) und Lehmann (Lit.13), die auch mit den Befunden von Wenzel (Lit.14) übereinstimmen, wird jedoch Östradiol im Uterus zu Östron oxidiert. Wird nun Androsten-17ol im Uterus ebenfalls oxidiert und läßt sich das Steroid durch Anwesenheit von Östron dort derart beeinflussen, daß es durch Wasserstoff-Transfer verstärkt oxidiert wird?

Neben der Beeinflussung des Stoffwechsels von Androsten-17ol im Uterus soll im zweiten Abschnitt dieser Arbeit die Beeinflussung der Bindung des Östradiol zu seinem Zielorgan Uterus mit Androsten-17ol untersucht werden. Hier soll geklärt werden, ob Östradiol tatsächlich eine Sonderstellung in bezug auf die Bindung zum Uterus besitzt.

Im dritten Abschnitt soll geklärt werden, ob die gegenseitige biochemische Beeinflussung von Androsten-17ol und Östradiol auch eine Parallelität in bezug auf die endokrinologische Wirkung von Androsten-17ol einerseits und Östradiol andererseits hat.

Anschließend wird diskutiert, ob man eventuell damit rechnen kann, daß mit Hilfe eines biologisch unspezifischen Steroids östrogenabhängige Prozesse beeinflußbar sind.

2. LITERATURÜBERSICHT

Zur Beurteilung eines Pharmakon wird die Abhängigkeit der Wirkung von der Konzentration und der Wirkungsmechanismus herangezogen. Darüber hinaus ist neben verschiedenen anderen Kriterien, die für eine Therapie unerläßlich sind, vor allem die Elimination des Pharmakon von großer Bedeutung. Hierunter versteht man allgemein all die Vorgänge, die zum Unwirksamwerden eines Pharmakon beitragen, wie die Ausscheidung durch verschiedene Organe und die chemische Umwandlung des Moleküls. So gibt es eine große Anzahl von chemischen Umwandlungsmöglichkeiten, die zu einem Wirkungsabfall oder Wirkungsverlust führen können.

Das Interesse dieser Arbeit gilt der Inaktivierung von Sexualhormonen in Stoffwechsel- und Erfolgsorganen der Ratte und dem Wirkungsmechanismus von Östradiol im Organismus.

Inaktivierung in Stoffwechselorganen

Allgemein bekannte Formen der Steroid-Inaktivierung sind die Glucuronisid- und Sulfatbildung der Steroide (Lit.15,16). Dazu kommen enzymatische Reaktionen, die nach dem Vorhandensein der unterschiedlichen funktionellen Gruppen der einzelnen Steroidhormone wirken.

Im Falle der C-17ß-Hydroxy-Steroide, mit denen sich diese Arbeit in der Hauptsache beschäftigt, kann es zu einer Inaktivierung durch Oxidation mit 17ß-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenasen kommen.

Dieses Enzym wurde im cytoplasmatischen Raum des Skelettmuskels des Kaninchens (Lit.17), in der Niere und Nebenniere von Säugetieren (Lit.18,19), in der menschlichen Placenta (Lit.20,21), sowie

in der Pferdeplacenta (Lit.22) nachgewiesen.

Die Leber soll neben cytoplasmatischen auch mikrosomale 17ß-Hydroxy-Steroid-Oxidoreduktasen enthalten (Lit.23,24,25), die auch in der menschlichen Placenta nachgewiesen wurden (Lit.26). Wasserstoffübertragend sind die Coenzyme NAD^+ und $NADP^+$. So kommen in der Leber zwei 17ß-OH-Steroid-Dehydrogenasen vor (Lit.27,28), die eine ist NAD-, die andere NADP-abhängig. Beide Dehydrogenasen katalysieren die Oxido-Reduktion am C-17-Atom eines Steroids. Diese Reaktion inaktiviert z.B. das Östradiol.

17ß-OH-Oxidoreduktasen aus Stoffwechselorganen Leber und Niere reagieren mit der 17ß-Hydroxyl-Gruppe von C-18- und C-19-Steroiden mit etwa der gleichen Geschwindigkeit (Lit.18,19,29,30). Dagegen soll vom Enzym aus Myometrium Östradiol als Substrat bevorzugt werden (Lit.31).

Wenzel et al. konnten eine selektive Tritium-Übertragung von 17aT-Östradiol (Lit.1,3,60,83) oder 11aT-Cortisol (Lit.2) auf biologisch wirksame Steroide wie 4-Androsten-3,17-dion, Progesteron oder Östron beweisen. Diese Erkenntnisse wurden auf eine entspreohende Spezifität mit hormonell inaktiven Steroiden als Wasserstoff-Akzeptoren (Lit.4) ausgeweitet. Interessant erschien auch hier eine Inaktivierung der Steroide durch Wasserstoff-Transfer zwischen Steroiden zu inaktiven Metaboliten.

Inaktivierung in Erfolgsorganen

Nach Talalay und Villée (Lit.33,34) können östrogenabhängige Transhydrogenasen durch Wasserstoffübertragung von NADH auf NADP den Stoffwechsel in den Zielorganen der Östrogene entscheidend beeinflussen; hierdurch sollen schließlich die bekannten physiologischen Wirkungen dieser Hormone hervorgerufen werden. Villée konnte (Lit.32) von der Transhydrogenaseaktivität eine Dehydrogenaseaktivität trennen, die den Wasserstoff vom

Substrat ablöst. Andere Autoren nehmen jedoch an, daß beide Reaktionen durch das gleiche Enzym katalysiert werden, und daß z.B. das Redoxpaar Östradiol/Östron als Transportmetabolit für den Wasserstoff dient (Lit.21,33).

Gegen diese Hypothese sprechen Befunde von Jensen und von Hecker und überzeugende Modelle über den Aufbau und die Wirkungsweise von Steroid-Hormon-Rezeptoren hormonabhängiger Organe (Lit.11,35,36,37).

Goodall und Schimke (Lit.38,39) halten es für denkbar, daß eine Kontrolle der Hormonwirkung durch eine Inaktivierung des Hormons im Erfolgsorgan selbst erfolgt, daß die Wirkung durch frühzeitige Eliminierung des unveränderten Hormons aus der Zelle begrenzt wird oder daß gleichzeitig mit der Aktivierung des Zellstoffwechsels eine Reihe von abbauenden Enzymen, z.B. Ribonucleasen oder Proteasen, induziert werden.

In den Erfolgsorganen der Androgene wurden ebenfalls 17ß-OH-Oxidoreduktasen nachgewiesen (Lit.40). Hiernach wird die Möglichkeit diskutiert, daß durch diese Enzyme die Konzentration des wirksamen Hormons in der Zelle und damit auch die Dauer der Hormonwirkung kontrolliert wird.

Für die Östrogene wurde eine derartige Kontrolle der Wirkung im Erfolgsorgan durch Oxidation zunächst abgelehnt (Lit.41,42). Jensen konnte zeigen, daß im Rattenuterus nur Östradiol gebunden wird und daß Östradiol im Uterus nicht zu Östron umgewandelt wird (Lit.11). Er schloß daraus, daß Östrogene in ihrem Erfolgsorgan grundsätzlich nicht umgewandelt werden können.

Nimmt man aber eine derartige Kontrollfunktion der 17ß-OH-Steroid-Dehydrogenase im Zielorgan an, so ist es denkbar, daß durch die Umwandlung von Östradiol zu Östron die Bindung des Hormons an den Rezeptor unterbleibt. Denn die geringere Aufnahme von Östron im Vergleich zu Östradiol durch den Rattenuterus haben Jensen und Jakobson (Lit.11) schon früher gezeigt. Es besteht aber

auch die Möglichkeit, daß Östradiol erst nach der Bindung an den Rezeptor des Uterus der Ratte zu Östron oxidiert wird.

Versuche von Wenzel et al. (Lit.14) legen nahe, daß Östradiol, in physiologischen Konzentrationen, im Uterus der infantilen Ratte oxidiert werden kann. Es wird sogar der Beweis eines separaten Weges des Wasserstoffs von C-17 des Östradiols in diesem Erfolgsorgan erbracht, der nur bei einer Östradiol-Oxidation möglich ist. Nach Angaben von Sweat et al. (Lit.43) soll auch im menschlichen Myometrium die Umwandlung von Östradiol zu Östron erfolgen. Auch in dem durch Dimethylbenzanthrazen-induzierten Mammacarcinom der Ratte wurde während der Phase der Hormonabhängigkeit die Umwandlung von Östradiol zu Östron nachgewiesen (Lit.44).

Diese Befunde beweisen ganz allgemein die Möglichkeit der Oxidation von Östradiol in hormonabhängigen Organen. Sie eröffnen die gedankliche Möglichkeit, in Erfolgsorganen Östradiol dadurch zu inaktivieren, daß man es durch Zugabe eines hormonell unwirksamen Wasserstoffakzeptors gezielt zu Östron oxidiert, was bereits für die Stoffwechselorgane bewiesen wurde.

Im Uterus ist ein T-Transfer von Östradiol auf Androsten-17on und Cortison (Lit.45,46) in geringem Maße nachgewiesen worden. In dieser Arbeit soll geprüft werden, ob man außer Östradiol auch noch ein anderes Steroid im Uterus oxidieren kann.

In diesem Falle kann man dann allerdings nicht von einer Inaktivierung des Steroids Androsten-17ol sprechen, denn es soll weder in der oxidierten noch in der reduzierten Form über eine biologische Aktivität verfügen.

Wirkungsmechanismus von Östradiol in Erfolgsorganen

Für den Mechanismus der Hormonwirkung soll neben der Aktivierung oder Inhibierung von Enzymsystemen in

der Zelle, der Induktion von Permeabilitätsveränderungen an Zellmembranen und an intrazellulären Strukturen (z.B. den Mitochondrien), auch die Aktivierung oder Inhibierung von Genorten (Lit.47) in Betracht kommen.

Dieser hormonelle Einfluß auf das Genom kann ganz allgemein als Startpunkt zur Realisierung hormoninduzierter Vorgänge, wie Stimulierung des Wachstums, Induktion von Funktionsleistungen, Reifungsprozessen usw. angesehen werden. Hiernach war noch nicht zu erklären, warum Hormone spezifisch aus dem Blutkreislauf in bestimmte hormonell gesteuerte Organe aufgenommen werden. Jensen (Lit.48) stellte fest, daß alle Organe, die keine Erfolgsorgane für Östradiol sind, ein anderes Aufnahmemuster als die Erfolgsorgane Uterus und Vagina zeigen. Die"unspezifischen" Gewebe zeigen in vivo ein sehr rasches Maximum der Inkorporation bei schneller Wiedergabe des Östradiol, während der Anstieg der Inkorporation in Uterus und Vagina langsam erfolgt. Dafür verbleibt aber das aufgenommene Östradiol für mehrere Stunden im Gewebe. Jensen hat die Hypothese aufgestellt, daß für diese spezifische Hormonaufnahme in die Erfolgsorgane bestimmte Gewebekomponenten verantwortlich sind, die er als "Hormonrezeptoren" bezeichnet hat.

Auf der Suche nach dem chemischen Aufbau der Rezeptoren fand man, daß der östradiolbindende Rezeptor, der sich zum größten Teil in Zellkern und Cytoplasma des Uterusgewebes befindet, aus Proteinen besteht.

Nach Lit.37 ergaben sich vier Bindungskriterien zur Definition eines Rezeptors, als Sammelbegriff für den Ort der Aufnahme und Wirkung und für den Kupplungsmechanismus. Voraussetzung sind also die Hormon-Spezifität, die Gewebe-Spezifität, die hohe Affinität und die Sättigung der Hormonaufnahme. Dementsprechend ist auch in vitro eine spezifische Östradiolaufnahme in Uterus und Vagina schon bei den sehr geringen Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-10} molar zu beobachten. Sie genügen um die cytoplasmatischen Rezeptoren zu besetzen. Erhöht

man die Konzentration, so läßt sich die Östradiolaufnahme weiter steigern, nimmt jedoch unspezifischen Charakter an und ist auch in hormonell nicht gesteuerten Organen anzutreffen.

Neben der organspezifischen Existenz von Hormonrezeptoren, besteht also auch noch eine Spezifität zur Bindung nur bestimmter Hormone an diese Rezeptoren. Jensen (Lit.48) fand, daß das nur schwach östrogen wirksame Östron nicht gebunden wurde. Später konnte dann allerdings gezeigt werden, daß der Rezeptor außer Östradiol auch noch andere Substanzen binden kann. Jedoch sollen Substanzen, die keine östrogene Aktivität besitzen, von den Rezeptoren nicht gebunden werden (Lit.49). Dagegen werden Substanzen mit östrogener Wirkung gebunden, auch wenn sie chemisch nicht zu den Steroiden gehören.

Eine sehr hohe Bindungskapazität haben die Rezeptoren auch für Antiöstrogene wie z.B. Clomiphen (Lit.50), CL 868 (Lit.51) und U-11100 A (Lit.54), die bei entsprechend hoher Dosierung die Östradiolbindung an den Uterus stark beeinträchtigen können. Steroide ohne östrogene Wirksamkeit sollen die Bindung des Östradiol nicht beeinträchtigen, während sie durch Zusätze von Diäthylstilböstrol um ca. 80%, durch Zusatz von U-11100 A sogar um 90% vermindert wird (Lit.49). Der Hauptteil der Bindungskapazität wird vonder jeweils zugesetzten Substanz durch kompetitive Verdrängung des Östradiol in Anspruch genommen.

Man kann davon ausgehen, daß bei kastrierten Tieren die Veränderungen des Uterus nach exogener Hormonzufuhr übereinstimmen mit den Vorgängen während des normalen Zyklus einer Ratte. Nach Gabe von 1µg Östradiol resultiert im Uterus der kastrierten Ratte ein signifikanter Anstieg des Uterusgewichts, sowie des RNS- und Proteingehalts pro Zelle, während eine biochemisch faßbare Zellvermehrung nicht zu beobachten ist (Lit.56). Die durch Östradiol induzierte Proteinvermehrung wird durch Progesteron gehemmt. Das erscheint sinnvoll, da Pro-

gesteron entsprechend seiner physiologischen Aufgabe den proliferativen Einfluß der Östrogene auf spezielle Zelldifferenzierungen umschaltet.

Substanzen, die Östrogene antagonisieren können, sind in Struktur und wahrscheinlich in der Art der Wirkung unterschiedlich. Der Antiöstrogentest durch Uterusgewichtszunahme gibt keinen Aufschluß über verschiedene Fragen: Hat der Antagonist eine direkte Wirkung auf das Zielorgan oder ist der beobachtete Effekt eine Sekundärreaktion auf Vorgänge, die an anderer Stelle des Körpers ablaufen? Ist es die hinzugegebene Verbindung selbst, die auf das Organ wirkt, oder ein Metabolit?

Das vermehrte Uteruswachstum ist das Endresultat einer komplexen Kette von Ereignissen, einschließlich z.B. der RNS-Synthese, ansteigender Protein- und Enzymsynthese. Die Inhibierung der Uterusgewichtszunahme könnte ein Resultat all dieser Punkte sein, wobei der Antagonist schon den auslösenden Schritt stören muß (Lit.57).

So ist aus dem Ergebnis eines solchen biologischen Tests keine Beantwortung der Art der Wirkung eines sogenannten Östrogen-Antagonisten zu erwarten; nur im Vergleich mit der biochemischen Wirkung kann man eventuell zu einer Abschätzung des Wirkungsmechanismus kommen.

Hormonabhängige Tumoren

Untersuchungen von King (Lit.52) an experimentell induzierten Mammakarzinomen der Ratte bewiesen, daß diese Tumoren eine den "normalen" Erfolgsorganen ähnliche Östradiolretention zeigen. Unterschiede in der Östradiolaufnahme hormonabhängiger und -unabhängiger Mammakarzinome der Ratte konnten jedoch erst von Mobbs (Lit.53) nachgewiesen werden. Es wurde danach zum ersten Mal ein direkter Zusammenhang zwischen Rezeptoraktivität und Hormonsensivität von Mammakarzinomen experimentell nachweisbar. Analoge Ergebnisse wurden auch bei später durchgeführten in vitro-Untersuchungen erhalten,

in denen Gewebeschnitte mit radioaktiv markiertem Östradiol inkubiert wurden (Lit.54,55).

Es erscheint also zulässig, die sich aus dieser Arbeit ergebenden Auswirkungen des Androsten-17ol auf das Erfolgsorgan des Östradiol mit eventuell zu erwartenden Auswirkungen auf hormonabhängige Mammakarzinome der Ratte zu vergleichen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Stoffwechsel von Androst-3-en-17ol und dessen Beeinflussung durch Östron in Organen der Ratte

3.1.1. Die Tritium-Übertragung von 17aT-Androsten-17ol auf Östron in Leberhomogenat und -schnitten männlicher und weiblicher Ratten

a. Stoffwechsel von Androsten-17ol und Identifizierung der Metabolite

Die im folgenden beschriebenen Versuche beweisen den Übergang des C-17-Wasserstoffatoms von Androsten-17ol auf die C-17-Position beim Östron.

Inkubiert man Leberhomogenat weiblicher Ratten mit 17aT-Androsten-17ol, so zeigt sich nach Dünnschichtchromatographie des Extraktes dieser Ansätze nur ein einziges radioaktives Maximum, nämlich das vom nicht verstoffwechselten 17aT-Androsten-17ol mit dem R_f 0,40 (Abb.1A+Tab.1A).

Inkubiert man dagegen das Steroid mit Leberhomogenat männlicher Tiere, so tritt neben dem Maximum des nicht verstoffwechselten 17aT-Androsten-17ol eine polarere Verbindung (R_f 0,21) auf (Tab.1A).

Gibt man den Ansätzen jedoch Östron als Wasserstoffakzeptor bei, so tritt ein weiteres radioaktives Maximum auf (Tab.1C).

Im Extrakt des Ansatzes mit weiblichem Leberhomogenat findet man neben dem Maximum vom R_f-Wert 0,4, das dem nicht umgesetzten 17aT-Androsten-17ol entspricht, ein weiteres radioaktives Maximum mit dem R_f-Wert 0,24

(Abb.1B+Tab.1C). Weiter unten wird gezeigt, daß diese Substanz mit Östradiol identisch ist.

Eine dünnschichtchromatographische Trennung des Inkubationsextraktes mit männlichem Leberhomogenat zeigt neben dem Maximum von nicht umgesetztem 17aT-Androsten-17ol, ebenfalls ein Maximum mit dem R_f-Wert 0,21-0,24 (Tab.1C).

Tab. 1 Tritium-Einbau aus 17aT-Androsten-17ol und 7aT-Androsten-17ol in HTO, Östradiol und einen weiteren Metaboliten

Es wurde mit männlichem und weiblichem Rattenleberhomogenat unter den gleichen Bedingungen wie in Abb.1 beschrieben gearbeitet.
+ Ausgangsverbindung
++ Darin R_f 0,21 enthalten

eingesetzt:	% der eingesetzten Aktivität in ♀	♂	Metabolit
A. Kontrollversuch: 17aT-Androsten-17ol	-	17,3±0,6	R_f 0,21
	70,0±4,2	51,0±3,3	R_f 0,40^{+}
	25,0±1,5	28,4±2,1	HTO
B. Kontrollversuch: 7aT-Androsten-17ol	-	24,5	R_f 0,21
	54,0	40,1	R_f 0,40^{+}
	40,0	30,5	R_f 0,61
	0,1	0,1	HTO
C. 17aT-Androsten-17ol + Östron	39,0	59,0^{++}	R_f 0,24^{++}
	43,0	25,5	R_f 0,40^{+}
	12,5	10,3	HTO

Vergleicht man die Aktivitätswiederfindungen der Inkubationen mit weiblichem und männlichem Leberhomogenat miteinander, so fällt auf, daß bei Inkubationen mit männlichem Leberhomogenat etwa 20% mehr Aktivität beim Metaboliten vom R_f 0,24 gefunden wird als bei weiblichem Homogenat. Umgekehrt findet man jedoch ca. 18% weniger Aktivität des Ausgangsproduktes bei männlichen Tieren als bei weiblichen Tieren. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß wie bei der alleinigen Inkubation von 17aT-Androsten-17ol ein polarerer Metabolit aufgetreten war, auch hier die Radioaktivität bei R_f 0,24 addierend verstärkt wurde. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein Hydroxylierungsprodukt, dessen Identität nicht näher untersucht wurde.

Um die bei der Inkubation von 17aT-Androsten-17ol und Östron in weiblichem Leberhomogenat neu gebildete radioaktive Verbindung vom R_f 0,24 zu identifizieren, wurde das entsprechende Maximum nach Rechromatographie im System Chloroform/Methanol 90/10 von der Dünnschichtplatte abgeschabt. Es wurde mit Aceton eluiert und mit inaktivem Östradiol umkristallisiert. Bei den verschiedenen Kristallisationen mit 100mg Östradiol aus Äthanol, Methanol und Dioxan blieb die spezifische Aktivität der Kristalle konstant (Tab.2).

Die fragliche Tritium-markierte Verbindung mit dem R_f 0,24 in Abb.1B ist, wie diese Versuche zeigen, mit Östradiol identisch und enthält das Tritium am C-Atom 17.

Wenn man Leberhomogenat weiblicher und männlicher Ratten mit 7aT-Androsten-17ol inkubiert, so treten nach Dünnschichtchromatographie der Extrakte dieser Ansätze unterschiedliche radioaktive Maxima auf.

Im Extrakt der Ansätze mit weiblichem Leberhomogenat findet man neben dem Maximum der Ausgangsverbindung ein weiteres radioaktives Maximum vom R_f 0,61, das dem R_f von Androsten-17on entspricht (Abb.1C+Tab.1B).

Tab. 2 Identifizierung von Tritium-markiertem Östradiol

Inkubation von 17aT-Androsten-17ol und Östron in weiblichem Leberhomogenat nach Abb.1

Methode zur Identifizierung	Ergebnisse
I. Inkubation mit 17aT-Androsten-17ol + Östron inaktiv und Chromatographie in Chloroform/Aceton 90/10	R_f = 0,24 (inaktive Referenzsubst. Östradiol R_f = 0,24)
II. Rechromatographie der Tritium-markierten Subst. aus I (R_f 0,24) in Chloroform/Methanol 90/10	R_f = 0,69 (inaktive Referenzsubst. Östradiol R_f = 0,69)
III. Tritium-markierte Subst. aus II (R_f 0,69) mit 100mg Östradiol umkristallisiert und Bestimmung der spezifischen Aktivität	Kristalle aus: IpM/mg 1. Äthanol 5091 2. Methanol 5079 3. Dioxan 5042
Ergebnis	Östradiol-17aT

Im Extrakt aus männlichem Leberhomogenat treten dagegen drei Maxima auf, von denen eines den R_f 0,61 hat, ein weiteres unumgesetztes 7aT-Androsten-17ol ist (R_f 0,40). Neben dem Oxidationsprodukt ist also noch ein weiterer Metabolit entstanden. Im R_f stimmt er mit dem oben bereits erwähnten Hydroxylierungsprodukt überein (Tab.1B).

Die Stoffwechselverhältnisse der Reaktion lassen sich durch das folgende Schema auf S.16 klarmachen. (Vergl. dazu Tabelle 1, R_f-Werte gemäß Tab.1)

eingesetzt	wiedergefundene Radioaktivität in
A. 17aT-Androsten-17ol ➧	HTO 17aT-Androsten-17ol (R_f = o,40) Hydroxylierungsprodukt von 17aT-Androsten-17ol (nur bei männlichen Tieren, R_f = 0,21) (hier entstehendes Androsten-17on ist nicht radioaktiv)
B. 7aT-Androsten-17ol ➧	7aT-Androsten-17ol (R_f = 0,40) 7aT-Androsten-17on (R_f = 0,61) Hydroxylierungsprodukt von 7aT-Androsten-17ol (nur bei männlichen Tieren, R_f = 0,21)
C. 17aT-Androsten-17ol + Östron ➧	HTO Östradiol (R_f = 0,24) 17aT-Androsten-17ol (R_f = 0,40) Hydroxylierungsprodukt von 17aT-Androsten-17ol (nur bei männlichen Tieren, R_f = 0,21)

b. Einfluß der verschiedenen Parameter auf den Wasserstoff-Transfer

Neben den Substratkonzentrationen bestimmen bei enzymatischen Reaktionen die Wasserstoffionenkonzentration, die Inkubationszeit und die Inkubationstemperatur die Umsatzgeschwindigkeit. Um die optimalen Bedingungen der Wasserstoffübertragung von 17aT-Androsten-17ol auf Östron zu ermitteln, wurde die Abhängigkeit von diesen Parametern untersucht. Auf eine Untersuchung der Temperaturabhängigkeit wurde verzichtet, weil sich die Körpertemperatur von 37°C als optimal für enzymatische Reaktionen erwiesen hat.

Wasserstoffionenkonzentration

Aus Abb.2 kann man die Abhängigkeit der Tritium-Übertragung von der Wasserstoffionenkonzentration im pH-Bereich 5-9 ablesen. Das Maximum der 17-Ketoreduktion von Östron durch 17aT-Androsten-17ol liegt bei pH 7,2-7,4. Eine Verschiebung der pH-Werte in den alkalischen Bereich erbringt eine unveränderte Wiederfindung des Metaboliten 17aT-Östradiol um 40%. Der Abbau des 17aT-Androsten-17ol zu Androsten-17on und HTO wurde anhand der HTO-Ausbeute und der Wiederfindung des 17aT-Androsten-17ol gemessen.

Ein Maximum des Substratumsatzes liegt bei pH 7,4 mit 40%. Ebenso liegt hier ein Maximum der HTO-Bildung mit 10%, welches ebenfalls als ein Maß für die Oxidation angesehen werden kann. Auch hier ergibt eine Wasserstoffionenkonzentrations-Änderung bis pH 9 keine Veränderung der Maxima. Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf die eingesetzte Aktivität von 17aT-Androsten-17ol, von der 85-90% wiedergefunden wurden.

Besonders deutlich wird die pH-Abhängigkeit des Tritium -Transfers zwischen den Steroiden, wenn man den Einbau vergleicht in 17aT-Östradiol und HTO. Bildet man wie in Abb.2 dargestellt den Quotienten aus der prozentualen Wiederfindung in 17aT-Östradiol und HTO, so findet man ein ganz deutliches Maximum bei pH 7,2. Hieraus kann man schließen, daß bei diesem pH der Wasserstoff, der von C-17 des Androsten-17ol abgelöst wird, bevorzugt auf die C-17-Position des Östron übergeht und Östradiol bildet. Der Einbau des Wasserstoffs in H_2O ist hier deutlich unterlegen. (Vergleiche auch Formelschema S.16.)

Um den Tritium-Transfer von 17aT-Androsten-17ol auf Östron möglichst quantitativ verlaufen zu lassen, wird bei den folgenden Inkubationen bei pH 7,2-7,4 gearbeitet.

Inkubationszeit

Abb.3 gibt die Abhängigkeit der Tritium-Übertragung von 17aT-Androsten-17ol auf Östron und H_2O von der Inkubationszeit wieder. Hieraus ergibt sich, daß der Umsatz innerhalb der ersten fünf Minuten stetig ansteigt, um bereits nach 10 Minuten ein Gleichgewicht zu erreichen. Nach 10 Minuten Inkubationsdauer erreicht die HTO-Bildung ein Maximum von 12% der eingesetzten Aktivität. Das Ausgangsprodukt 17aT-Androsten-17ol wird um 40%, der Metabolit 17aT-Östradiol wird ebenfalls um 40% gefunden. Daraus ergibt sich, daß bei künftigen Inkubationen eine Inkubationszeit von 10 Minuten ausreicht.

Konzentration der Steroide

Alle bisherigen Versuche zum Tritium-Transfer von 17aT-Androsten-17ol auf Östron wurden bei konstanten Steroidkonzentrationen durchgeführt. Die weiteren Experimente sollten die Frage nach der Abhängigkeit des Transfers von der Konzentration der beiden Steroide klären.

Inkubiert man 17aT-Androsten-17ol ohne einen Akzeptor, so findet man erwartungsgemäß etwa 70% der eingesetzten Aktivität an unumgesetztem 17aT-Androsten-17ol wieder, während 25% als HTO wiedergefunden werden. Gibt man den Ansätzen nur 10 µMol Akzeptor Östron hinzu, so findet man bereits 40% der Aktivität im Metaboliten 17aT-Östradiol wieder, während 12% HTO gefunden werden. 40% Donator werden nicht umgesetzt.

Steigert man das Akzeptorangebot weiter bis auf 1000 µMol/l, so bleiben die prozentualen Wiederfindungen der einzelnen Aktivitäten unverändert. Daraus ergibt sich, daß bei einer Donatorkonzentration von 0,1 µMol/l eine Akzeptorkonzentration von 10 µMol/l bereits ausreicht, einen maximalen Tritium-Transfer zu bewirken (Abb.4). Mögliche Ursachen dafür werden weiter unten ausgeführt.

Besonders deutlich wird die Spezifität des Transfers, wenn man die Konzentration des Donatorsteroids bei gleichbleibender Akzeptorkonzentration variiert, denn bei einer geringen Donatorkonzentration gibt es eine Konkurrenz mit anderen H-liefernden Zellsubstraten. Je geringer die Konzentration des Donators ist, desto größer ist der prozentuale Tritiumeinbau in den Akzeptormetaboliten, desto höher ist aber auch die prozentuale HTO-Bildung. Bei zunehmender Donatorkonzentration nimmt der relative Einbau von Tritium in 17aT-Östradiol rasch ab (Abb.5).

Hierbei wird bei einer Konzentration bis 10 µMol/l von 17aT-Androsten-17ol mehr als 2,5 mal soviel Tritium in die Position 17 von Östradiol eingebaut, wie Tritium-Wasser gebildet wird. Bei der Erhöhung des Donatorangebotes auf 50 µMol/l nimmt der Einfluß von Östron auf die Oxidation des Androsten-17ol ab. Nur noch 18% des Metaboliten Östradiol werden gefunden, 60% der Aktivität verbleiben im Donator. Die HTO-Ausbeute bleibt unverändert bei 12%.

Aus den Abbildungen 4 und 5 kann man schließen, daß der Einfluß des Östron auf die Oxidation des Androsten-17ol in engem Zusammenhang mit der unspezifischen HTO-Bildung steht: Das Tritium, das durch Oxidation abgespalten wird, wird bevorzugt zur Reduktion des Akzeptorsteroids verwandt und nicht zur Bildung von HTO. Dabei kommt es zu einer Konkurrenz zwischen Östradiol und der Atmungskette um das aus Androsten-17ol gebildete NADT.

Diese Konkurrenz tritt aber nur bis zu einer Akzeptorkonzentration von 10 µMol/l auf. Bei höheren Akzeptorkonzentrationen bleibt die HTO-Ausbeute konstant (Abb.4).

In Abb.5 fällt auf, daß die HTO-Ausbeute ab 10 µMol/l Donator konstant bleibt, obwohl die Ausbeute an 17aT-Östradiol sinkt. Man sollte annehmen, daß durch Erhöhung des Donatorangebotes auch die prozentuale HTO-

Ausbeute sinkt, vor allem wenn man bedenkt, daß der von C-17 eines Steroids abgelöste Wasserstoff bevorzugt dazu verwandt wird, ein Akzeptorsteroid an C-17 zu reduzieren.

NADH ist nicht nur ein Coenzym der 17ß-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase, sondern auch "Substrat" der Atmungskette (Lit.58). C-17-Ketoreduktion und H_2O-Bildung in der Atmungskette müßten also gleichermaßen um das Coenzym "konkurrieren", das vorher vom T-Hydrid-Ion des 17ß-Hydroxy-Steroids zum NADT reduziert worden ist. Dabei muß man bedenken, daß nach Abb.10 20% von 50 µMol/l Donator gleich 10 µMol/l und 50% von 1 µMol/l gleich 0,5 µMol/l darstellen. Da die Akzeptorkonzentration nur 10 µMol/l beträgt, kann folgerichtig auch nur 10 µMol/l Donator-Wasserstoff auf das Östron übergehen (=Metabolit). Somit ist erklärlich, daß mit steigender Donatorkonzentration die relative Metabolitenbildung abnehmen muß.

Die Oxidation von Androsten-17ol zu H_2O bei Östron-Zugabe dagegen steigt proportional mit der Androsten-17ol-Konzentration. Dabei sind 10% von 10 µMol/l gleich 1 uMol/l H_2O, und 10% von 50 µMol/l sind 5 uMol/l H_2O.

Alle Inkubationen zu diesem Kapitel wurden in weiblichem Leberhomogenat vorgenommen. Nach 3.1.1. verfälschten nämlich in Homogenaten männlicher Tiere unerwünschte Nebenprodukte - vermutlich durch Hydroxylierung - das Bild des Tritium-Transfers, weil Östradiol und das Hydroxylierungsprodukt des Donators gleiche R_f-Werte besitzen (Tab.1).

Bei Inkubationen mit Leberschnitten ergab sich grundsätzlich das gleiche Bild, die Metabolisierung gelang jedoch im allgemeinen etwas besser.

3.1.2. Organ- und Sexualspezifität

In diesem Abschnitt wurden die Sexualorgane männlicher und weiblicher Ratten, sowie Niere und Leber als

Stoffwechselorgane verwandt. Das Diaphragma sollte als Kontrolle dienen, da es über keine Enzymaktivitäten der Steroid-Dehydrogenasen verfügen soll.

Das Diaphragma läßt erwartungsgemäß keinen Tritium-Transfer zwischen 17aT-Androsten-17ol und Östron erkennen, jedoch ist auch im Ovar und in den Testes kein Transfer zu messen, denn es entsteht kein Östradiol (Schraffierte Teile in Abb.6).

Nur die Niere scheint neben der Leber über Enzymaktivitäten zu verfügen, die einen spezifischen Tritium-Transfer ermöglichen. In der Niere männlicher und weiblicher Tiere findet man etwa 5-10% der Aktivität beim R_f des 17aT-Östradiol wieder. In der Niere weiblicher Tiere ist scheinbar der Tansfer geringer als bei Männchen. Bei diesen täuschen vermutlich Hydroxylierungsprodukte des Donators, die den gleichen R_f-Wert wie Östradiol haben, einen erhöhten Transfer vor.

Bemerkenswert war der Befund, daß im Uterus kein Tritium-Transfer von Androsten-17ol auf Östron nachzuweisen war. Der T-Transfer vom 17aT-Östradiol auf Androsten-17on konnte dagegen in sehr geringem Ausmaß nachgewiesen werden (Lit.45,46). Möglicherweise besitzt der Uterus nur Enzyme für einen T-Transfer Östradiol ⟶ Androsten-17on und nicht für Androsten-17ol ⟶ Östron, obwohl das unwahrscheinlich ist. Dieser fehlende Transfer mag auch darauf zurückzuführen sein, daß Östron im Uterus nicht zu Östradiol reduziert werden kann (Lit.59).

Dagegen gilt es als bewiesen, daß Östradiol im Uterus der Ratte (Lit.14) und im Myometrium des Menschen (Lit.43) zu Östron oxidiert wird. Jütting gelang es, die uterine 17ß-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase aus dem Myometrium trächtiger Tiere anzureichern und teilweise zu charakterisieren (Lit. 12). Hieronimus und Ahlers (Lit.45,46) fanden einen eindeutigen Tritium-Transfer von 17aT-Östradiol auf Androsten-17on.

Im Zusammenhang damit können die eigenen Befunde nur dahingehend gedeutet werden, daß der Uterus der Ratte über eine 17ß-OH-Steroid-Dehydrogenase verfügt, die ausschließlich Östradiol oxidiert. Nur der vom Östradiol abgelöste Wasserstoff kann dann in einem nächsten Reaktionsschritt zur Reduktion von 17-Ketosteroiden verwandt werden.

Versuche mit anderen Wasserstoff-Akzeptoren als Östron, die sich in Leberhomogenat als reduzierbar erwiesen hatten (3.1.3.), wurden von Androsten-17ol-Wasserstoff im Uterus auch nicht reduziert.

3.1.3. Substrat- und Coenzymspezifität

Versuche von Wenzel et al. (Lit.4) zeigten, daß es eine hohe Spezifität der Wasserstoffübertragung von 17-Hydroxysteroiden auf 17-Ketosteroide im Vergleich zu anderen biologischen Wasserstoff-Donatoren gibt, welche ebenfalls Wasserstoff an NAD bzw. NADP liefern. Nach Wenzel et al. (Lit.1,3,60) sind neben der 17-Ketogruppe auch andere funktionelle Gruppen des Steroid-Moleküls reduzierbar. Nach Wenzel und Mützel hatte sich das Androsten-17on als bevorzugter Wasserstoff-Akzeptor unter den Steroiden erwiesen, deren biologische "Unwirksamkeit" einen therapeutischen Nutzen erwarten ließen (Lit.4). Dies erschien interessant im Hinblick auf eine spezifische Oxidation des Östradiol.

Die bisherigen Befunde deuteten auf einen biochemischen Antagonismus zwischen Androsten-17ol und Östron hin. In diesem Kapitel sollte geprüft werden, ob nicht auch andere Ketosteroide gleichermaßen als Wasserstoff-Akzeptoren für den von der 17-Stellung abgelösten Wasserstoff des Androsten-17ol fungieren können.

Bei der Inkubation von weiblichem Rattenleberhomogenat mit Östron als Akzeptor wurden 40% der Aktivität des 17aT-Androsten-17ol beim Metaboliten 17aT-Östradiol

wiedergefunden. Dies war der einzige Metabolit, bei Zugabe anderer Akzeptoren waren die Verhältnisse ähnlich (Vergl.Tab.3).

Wenn man Androst-4-en-3,17-dion als Wasserstoff-Akzeptor den Inkubationsansätzen mit 17aT-Androsten-17ol hinzugibt, so findet man 45% als 17aT-Testosteron wieder (R_f 0,26).

Bei der Zugabe von 5a-Androstan-3,17-dion findet man neben dem Maximum von nicht umgesztztem 17aT-Androsten-17ol zwei weitere Maxima, von denen eines vom R_f-Wert 0,35 dem 5a-Androstan-3-on-17ol entspricht und 15% der Aktivität ausmacht. Insgesamt wurden hier nur 25% der Aktivität des Donators metabolisiert.

Inkubiert man 17aT-Androsten-17ol mit Progesteron, so findet man 8% der Aktivität neben unumgesetztem Androsten-17ol wieder bei einem R_f-Wert, der dem des 20a-Hydroxy-Progesteron entspricht.

Tab. 3 Substratspezifität des Tritium-Transfers von 17aT-Androsten-17ol auf verschiedene Steroide

Es wurde mit weiblichem Rattenleberhomogenat gearbeitet. Einzelheiten der Bedingungen siehe Methodik. Chromatographie in Chloroform/Aceton 90/10

Steroidkonzentrationen:
17aT-Androsten-17ol 0,1 µMol/l
Akzeptorsteroide 10 µMol/l
$^{+}$identifiziert durch R_f-Wert
$^{++}$nicht identifiziert

DONATOR: 17aT-Androsten-17ol

T - AKZEPTOR	T-markiertes Reduktionsprodukt	Ausbeute
Östron	Östradiol	40%
Androst-4-en-3,17-dion	Testosteron^{+}	45%
5a-Androstan-3,17-dion	5a-Androstan-3-on-17ol+	15%+10%$^{++}$
Progesteron	20a-OH-Progesteron^{+}	8%

Die 17ß-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase der Leber, die wir auch für den Wasserstoff-Transfer verantwortlich machen, besitzt keine Substratspezifität. Neben Östradiol wird auch die 17-OH-Gruppe des Testosteron oxidiert (Lit.27,28). Diese katalysierten Reaktionen sind reversibel. Entsprechend finden wir auch hier eine Reduktion der 17-Ketofunktion von Östron, Androstendion und Androstandion.

Jedoch scheint sicher zu sein, daß im Vergleich zu anderen funktionellen Gruppen der Tritium-Transfer von der 17-Stellung bevorzugt auf C-17 eines reduzierbaren Steroids abläuft.

Es erweist sich also, daß die verschiedenen Steroidumwandelnden Reaktionen keine bemerkenswerte Substratspezifität besitzen. Anscheinend werden sie durch dasselbe Enzymsystem katalysiert. Hier stellt sich die Frage nach dem wasserstoffübertagenden Coenzym. Nach Endahl und Kochakian (Lit.27,28) kommen in der Leber zwei 17ß-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenasen vor, wobei die eine NAD-, die andere NADP-abhängig ist. Beide Dehydrogenasen katalysieren die Oxidoreduktion am C-17 eines Steroids. Die Enzyme werden in den Mikrosomen und die Coenzyme in den cytoplasmatischen Strukturen des Gewebes lokalisiert. Durch eine Fraktionierung des Lebergewebes müßte eine Trennung in eine coenzymhaltige Cytoplasmafraktion und eine mikrosomale Enzymfraktion erreicht werden.

Diese Auftrennung des Gewebes sollte also dazu dienen, durch Zugabe von NAD bzw. NADP dasjenige Coenzym zu ermitteln, das bevorzugt in der Lage ist, einen Tritium-Transfer zu bewirken (Vergl.Abb.7).

Ohne Zugabe von Coenzym ist erwartungsgemäß kein Tritium-Transfer im Cytoplasma zu erreichen. Inkubationen mit der Mikrosomenfraktion ergaben einen geringen T-Transfer auch ohne Zugabe von Coenzym, woraus zu schließen ist, daß die Abtrennung dieser Fraktion nicht völlig sauber gelungen ist.

Gibt man dem Cytoplasma NAD oder NADP als Coenzym hinzu, so ist kein Tritium-Transfer zu messen, was die Abwesenheit des Enzyms beweist. Fügt man jedoch der Mikrosomenfraktion NAD hinzu, so findet ein Tritium-Transfer von 85% statt, wobei nur 1% HTO zu finden ist. 2,5% HTO findet man, wenn man den Inkubationsansätzen den Akzeptor Östron hinzugibt (Tab.4).

Vergleicht man gemäß Tab.4 die HTO-Ausbeuten aus Cytoplasma und Mikrosomenfraktion mit der HTO-Bildung im Homogenat weiblicher Rattenleber, so beweist sich, daß es in Mikrosomen und Cytoplasma keine Konkurrenz zwischen Östradiol und der Atmungskette gibt. Die Oxidation von NADT zu HTO ist folglich nur in den Mitochondrien möglich. Infolgedessen betrug die HTO-Bildung im Homogenat 12% bzw. 25% (Vergl.3.1.1.).

Die HTO-Ausbeuten bei NADP-Zugabe sind in beiden Fällen so groß wie bei NAD-Zugabe, während der Tritium-Transfer nur 20% beträgt (Abb.7, die HTO-Ausbeuten sind hier nicht dargestellt).

Tab. 4 Vergleich der HTO-Ausbeuten in Cytoplasma, Mikrosomen und Homogenat aus weiblicher Rattenleber

Inkubationsbedingungen vergleiche Abb.7 und 4. In Abb.4 sind % HTO der eingesetzten Aktivität dargestellt, nach Abb.7 ergeben sich % HTO der wiedergefundenen Aktivität. Die Werte sind vergleichbar, da sich wiedergefundene Aktivität zu eingesetzter Aktivität wie 9 : 10 verhält. (n=3)

Fraktion	% HTO		% Östradiol
	mit Östron-Zugabe	ohne Östron-Zugabe	
Mikrosomen +NAD	1,1	2,5	85,5
Cytoplasma +NAD	0,1	1,8	0
Homogenat	12,0	25,5	40,0

Im Vergleich zum Gewebehomogenat ist also der Tritium-Transfer bedeutend größer in der abgetrennten Mikrosomenfraktion, wenn man einen Überschuß an NAD hinzugibt. NADP scheint nicht bevorzugt den T-Transfer zu beeinflussen.

5a-Androstan-3,17-dion und Androst-4-en-3,17-dion als Akzeptoren bevorzugen ebenfalls NAD als Coenzym für den Tritium-Transfer. Der Umsatz zu Testosteron und Androstan-3-on-17ol liegt bei beiden Substraten bei ca. 95%, im Vergleich zu 25% bzw. 45% im Gewebehomogenat (Vergl.Tab.3). NADP allein ergibt nur einen Transfer von 22%, ähnlich den Befunden bei Östron-Zugabe (Ergebnisse nicht dargestellt).

Es ergibt sich also, daß die Befunde der Literatur für die Oxidoreduktion an C-17 eines Steroids bezüglich der Coenzymspezifität auch für den Tritium-Transfer von von Androsten-17ol auf andere 17-Ketosteroide Anwendung finden. Auch dieser enzymatische Schritt ist NAD- und NADP-abhängig.

3.1.4. Beeinflussung der Oxidation von Androst-3-en-17ol durch Östron und Östradiol in vivo und in vitro

In einem früheren Versuch (3.1.1.b.) wurde bereits eine Abhängigkeit der Androsten-17ol-Oxidation bei Zugabe von Östron anhand der Tritium-Einbauten in HTO und 17aT-Östradiol von der Zeit in vitro nachgewiesen. In diesem Abschnitt soll der Einfluß des Akzeptors Östron auf eine mögliche Beschleunigung der Androsten-17ol-Oxidation gezeigt werden.

in vitro

Wird 7aT-Androsten-17ol mit Leberschnitten weiblicher Ratten inkubiert, so kann man an der Menge des unumgesetzten 7aT-Androsten-17on den Grad der Oxidation messen. Gemäß Abb.13 beträgt die Androsten-17ol-Konzen-

tration nach 15 Minuten 51%, und es sind 46% Androsten-17on entstanden.(In Abb.8 sind bereits die Quotienten Androsten-17ol/Androsten-17on aus dem Gehalt an Androsten-17ol und Androsten-17on gebildet worden.)

Wird den Ansätzen ein hundertfacher Überschuß an Östron hinzugegeben, dann erfolgt eine eindeutig beschleunigte Oxidation von Androsten-17ol zu Androsten-17on. Es werden nach 15 Minuten 54% Androsten-17on gefunden und nur noch 38% Androsten-17ol. Gibt man den Ansätzen einen hundertfachen Überschuß an Östradiol hinzu, so wird die Oxidation des Androsten-17ol stark verlangsamt. Nach 15 Minuten findet man noch 58% Androsten-17ol und nur 8% Androsten-17on.

Aus den Quotienten Androsten-17ol/Androsten-17on wird der Einfluß von Östron und Östradiol auf die Oxidation des Androgens besonders deutlich. Die Quotienten der Kontrolle, also ohne Zugabe eines zweiten Steroids, liegen um 1,1 bis 1,6. Gibt man Östron hinzu, so verkleinern sie sich auf 0,3 bis 0,7, d.h. also, es ist vergleichsweise mehr Androsten-17on (im Nenner) als Androsten-17ol wiedergefunden worden. Gibt man jedoch Östradiol hinzu, werden die Quotienten größer: 2,6 nach 15 Minuten und 7,3 nach 45 Minuten Inkubationszeit; es wird also nur noch relativ wenig Androsten-17ol oxidiert. Das liegt vermutlich daran, daß bevorzugt das im Überschuß vorhandene Östradiol oxidiert worden sein muß.

in vivo

Durch "stoffwechsellabile" Markierung mit Tritium gelingt es, die Oxidation von Androsten-17ol am C-17 im Gesamtorganismus eines Versuchstieres durch Aktivitätsmessung des Wassers der ausgeatmeten Luft zu ermitteln (Lit.61).

Es wurde die Mindestoxidation von 17aT-Androsten-17ol in männlichen und weiblichen Ratten ermittelt und im Hauptversuch die Oxidationsgeschwindigkeit des Andro-

sten-17ol bei gleichzeitiger subcutaner Injektion von Östron und Östradiol untersucht.

In männlichen Tieren wurde insgesamt mehr Androsten-17ol oxidiert als in weiblichen Tieren (Vergl.Abb.9 und 10). Insgesamt wurde Androsten-17ol in männlichen Tieren nach 24 Stunden zu 80%, in weiblichen Tieren zu 65% oxidiert. (24 Stunden-Werte nicht dargestellt.)

Östron hat einen unterschiedlichen Einfluß auf die Androsten-17ol-Oxidation in den beiden Geschlechtern. Die Zugabe von einem hundertfachen Überschuß Östron beschleunigt in männlichen Tieren erheblich die Oxidation. Bei weiblichen Tieren ist dies nicht der Fall; hier wirkt die Zugabe von Östron verlangsamend auf die Oxidation. Die Ursache wird weiter unten diskutiert. In männlichen Tieren steigt die Androsten-17ol-Oxidation nach 8 Stunden auf 60% im Vergleich zu 45% ohne Östron-Zugabe, in weiblichen Tieren sinkt sie auf 35% im Vergleich zu 45% ohne Östron-Zugabe.

Die gleichzeitige Applikation von Östradiol verlangsamt die Androsten-17ol-Oxidation in beiden Geschlechtern. Nach 8 Stunden wird in männlichen Tieren 38%, in weiblichen Tieren sogar nur 15% Androsten-17ol oxidiert (Abb.9,10).

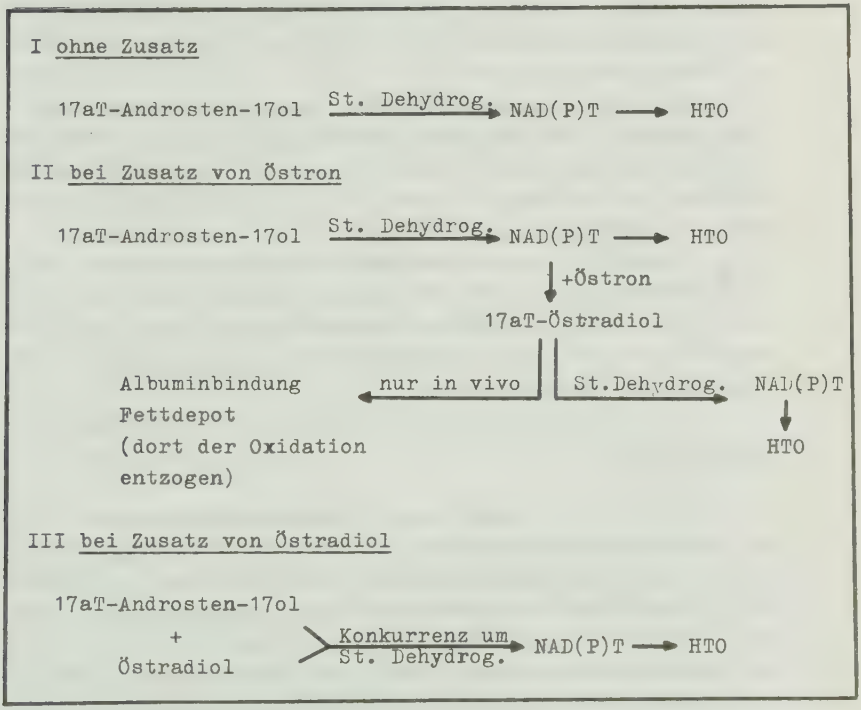
Die in vivo-Oxidation des Androsten-17ol in infantilen Ratten war insgesamt der Oxidation in erwachsenen Tieren weit unterlegen, aber auch hier zeigten männliche Tiere eine stärkere Oxidation als weibliche Tiere, wobei eine Oxidation zu 12-15% vergleichsweise gering war.

Vergleicht man die Oxidation von Androsten-17ol bei gleicher Dosis mit der Östradiol-Oxidation in weiblichen infantilen Ratten miteinander (Abb.11), so fällt auf, daß Östradiol bedeutend stärker oxidiert wird - bis zu 45% nach 8 Stunden - im Vergleich zu Androsten-17ol (10%).

Die in vitro- und in vivo-Befunde lassen für weibliche Tiere keine Parallelität des Östron-Einflusses erkennen. Die Zugabe von Östron verstärkt die Androsten-

17ol-Oxidation (gemessen an der HTO-Bildung nach Abb.4) in Lebergewebe in vitro, dagegen nicht im Gesamtorganismus. Hier verlangsamte Östron sogar die Oxidation, was auf eine Reduktion des Östron im intermediären Stoffwechsel zu Östradiol zurückzuführen sein mag. Nach beiden Methoden wirkte nämlich die Zugabe von Östradiol inhibierend bei der Androsten-17ol-Oxidation.

Das nachstehende Schema soll allgemein den Unterschied der Oxidation eines Donatorsteroids unter Östron- oder Östradiol-Zugabe im Gesamtorganismus und Leberhomogenat einer weiblichen Ratte erläutern.



Gesamtorganismus:

Ohne Zugabe eines Akzeptorsteroids steht das gesamte aus 17aT-Androsten-17ol gebildete NADT/NADPT zur Bildung von HTO in der Atmungskette bereit (I). Gibt man jedoch einen Akzeptor (Östron) im Überschuß hinzu (II), so besteht ein großer Bedarf an Wasserstoff zur Reduktion der Ketogruppe. Da der vom Donator (Androsten-17ol) stammende Anteil (in Form von Tritium) zur Reduktion allein nicht ausreicht, wird demnach das Tritium durch den Wasserstoff körpereigener Substrate verdünnt. Es resultiert als Ergebnis der Reduktion ein Gemisch aus (T)- und (H)-Hydroxysteroiden (Östradiol), die sekundär oxidiert werden. Dabei gibt es eine Konkurrenz der Steroide um die Steroid-Dehydrogenasen wie in III. Die HTO-Ausbeute sinkt.

Eine andere Möglichkeit wäre, daß primär entstandenes T-Östradiol - durch den Kreislauf ausgeschleust - in Fettdepots eingelagert wird und nicht mehr zur Oxidation zur Verfügung steht. Ergebnis wäre auch in diesem Fall eine geringere HTO-Bildung.

Gibt man den Tieren als Konkurrenz-Steroid inaktives (H)-Hydroxy-Steroid (Östradiol) hinzu (III), so konkurriert Östradiol um die Steroid-Dehydrogenasen und besetzt einen Teil der Enzymkapazität; es entsteht weniger HTO aus Androsten-17ol.

Leberhomogenat:

Die in vitro-Verhältnisse bei Östron-Zugabe sind nur deswegen anders, weil ein großer Teil der im Homogenat angebotenen NAD/NADP-Anteile bereits durch die Oxidation des T-Donators (Androsten-17ol) verbraucht werden. Die Zugabe eines Akzeptorsteroids steigert nur deswegen die HTO-Ausbeute, weil nicht genügend zelleigene Substrate verfügbar sind, die das Tritium durch Wasserstoff verdünnen können, wenn Androsten-17ol oxi-

diert wird. Das entstehende (T)-Hydroxy-Steroid (Östradiol) muß bei der sekundären Oxidation nicht mit (H)-Hydroxy-Steroid um die Steroid-Dehydrogenasen konkurrieren. Es entsteht mehr HTO aus Androsten-17ol.

Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, auch in vitro die gleichen Ergebnisse wie in vivo zu erzielen, wenn man genügend Zellmaterial zur Inkubation verwendet.

Die in vivo-Befunde bei männlichen Tieren zeigen, daß Androsten-17ol erheblich besser oxidiert wird als in Weibchen. Die Zugabe von Östron steigert sogar die Oxidation. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß bei männlichen Tieren, wie in Lit.82 für Östradiol bewiesen, 17-OH-Steroide in vivo besser oxidiert werden als in weiblichen Tieren. Auch im vorliegenden Beispiel gehen wir davon aus, daß T-Östradiol im intermediären Stoffwechsel durch T-Transfer 17aT-Androsten-17ol ⟶ Östron entstanden ist. 17aT-Östradiol wird nun vermehrt oxidiert. Man versteht jedoch nicht, warum Androsten-17ol dann nicht direkt (also auch schon ohne Östron-Zugabe) so stark oxidiert wird.

Die Östradiol-Zugabe hemmt in männlichen Tieren weniger die Androsten-17ol-Oxidation als in weiblichen Tieren. Dies mag auch darauf zurückzuführen sein, daß die Kapazität der 17ß-OH-Steroid-Dehydrogenase in Männchen größer ist als in Weibchen.

3.2. Metabolismus und Biochemie von Androst-3-en-17ol im Uterus der Ratte

Organe wie Uterus und Vagina zeigen eine hohe Affinität zu östrogenen Substanzen, insbesondere zum 17ß-Östradiol. Diese Östradiol-Bindung soll über spezifische Rezeptoren möglich werden, über die die Erfolgsorgane verfügen. Die Wirkung der Östrogene auf die Erfolgsorgane soll danach nur über eine Hormon-Rezeptor-Bindung möglich sein. Nach Korenman und Brecher (Lit.62, 62a), soll die Hormon-Rezeptor-Bindung von dem Kohlen-

stoffgerüst des Östradiol und den OH-Funktionen an C-3 und C-17 abhängen. Vonderhaar und Mueller (Lit.63) halten die Erhaltung der gesamten Molekülgrundstruktur für wesentlich für das Zustandekommen der Hormon-Rezeptor-Bindung. Substanzen dagegen, die keine östrogene Aktivität besitzen, werden von den Rezeptoren nicht gebunden (z.B. 17a-Östradiol, Testosteron, Cortison u.a. Lit.49).

Der Rezeptor-bedingten Wirkung auf den Uterus stellen andere Autoren dennoch biologische und biochemische Wirkungen auf die Erfolgsorgane der Östrogene von nicht-östrogenen Substanzen entgegen. Nach Velardo (Lit.64) erreicht z.B. Testosteron in einer 3,5 mal 10^3-fachen Konzentration von Östron das gleiche Uteruswachstum. Lerner (Lit.65) erhält einen ähnlichen Effekt mit Testosteronpropionat.

Terenius (Lit.66) behauptet, daß Testosteron in vivo nicht in der Lage sei, die Östrogenkonzentration im Zielorgan zu vermindern, aber das Feuchtgewicht des Uterus erhöht und sogar die Östradiolkonzentration im Uterus und in der Vagina ansteigen läßt. Danach sind die Rezeptoren des Östradiol also durch Testosteron nicht zu blockieren.

Velardo (Lit.64) weist nach, daß z.B. eine biologische Wirkung des Östradiol - das Uteruswachstum - durch Testosteron nur in sehr geringem Maße hemmbar sei. Dem widersprechen Befunde von Lerner (Lit.65), daß Östrogen-Wirkungen durch Gestagene, Androgene und Corticoide hemmbar sind, was auch mit Befunden von Pincus et al. (Lit.67) übereinstimmt.

In den folgenden Versuchen soll geklärt werden, ob die C-19-Steroide Androsten-17ol und -17on

1. in der Lage sind, den Stoffwechsel von Östradiol in den Zielorganen und damit die Östradiolwirkung auf den Uterus zu beeinflussen,
2. wie Östradiol eine Affinität zu Uterus und Vagina besitzen.

3.2.1. Gewebeaffinität von Androsten-17ol in vitro und in vivo

Nach Wenzel et al. (Lit.14) und eigenen Befunden beträgt der Tritium-Einbau aus Östradiol bei Inkubation mit 10^{-9} Mol/l in das Gewebe des Uterus 3-4% der eingesetzten Aktivität. Inkubationen mit gleichen Konzentrationen von Androsten-17ol ergeben dagegen einen Tritium-Einbau von 8-10%. Um ausschließlich das radioaktive Androsten-17ol, das tatsächlich umgesetzt bzw. an das Gewebe gebunden vorliegt, zu erfassen, wurden nach der Inkubation mit den radioaktiven Steroiden die Uteri mit hundertfach erhöhter Konzentration inaktiver Steroide nachinkubiert. Dadurch wird nicht umgesetztes bzw. gebundenes Steroid aus dem Uterusgewebe entfernt. Bei dieser Nachinkubation werden etwa nur 25% der ursprünglich vom Uterus inkorporierten Tritium-Aktivität aus Androsten-17ol ausgewaschen, im Vergleich zu 80-90% bei Inkubationen mit Östradiol.

Hierbei unterscheiden sich die prozentualen Einbauten aus "stoffwechsellabil"-markiertem 17aT-Androsten-17ol und "stoffwechselstabil"-markiertem 7aT-Androsten-17ol nur wenig, während das Verhältnis des Tritium-Einbaus 17aT-Östradiol : 6,7-T-Östradiol wie 2:1 war.

Die Einbauraten in infantiles und erwachsenes Gewebe unterschieden sich nicht wesentlich voneinander. In den weiteren Versuchen sollte jedoch Gewebematerial infantiler Ratten verwandt werden. Das diente dazu, eine mögliche endogene Östrogenwirkung auf den Uterus auszuschließen, was bei Tieren vor der Geschlechtsreife gewährleistet ist (Abb.12).

Nach Jensen et al. (Lit.68) und Wenzel et al. (Lit.14) ergaben in vivo-Applikationen infantiler Rattenweibchen mit Östradiol eine Bevorzugung des Uterus über mehrere Stunden. Im Vergleich zu anderen Geweben konnten analoge Befunde bei in vivo-Injektionen mit 17aT-Androst-3-en-17ol und einem zum Vergleich heran-

gezogenen Steroid, dem 17aT-Androst-2-en-17ol, nicht realisiert werden. Kurz nach der Injektion stieg zwar der Aktivitätsspiegel in allen zum Vergleich herangezogenen Gewebeteilen an, blieb aber nach vier Stunden Wirkungsdauer nur in der Leber deutlich über dem Niveau aller anderen Organe. Eine Bevorzugung des Uterus nach in vivo-Applikationen konnte also im Gegensatz zu den Befunden mit Östradiol-Injektionen nicht bewiesen werden (Abb.13).

Mißt man die in vitro-Einbauraten aus 17aT-Östradiol in verschiedene Organe infantiler Ratten, so zeigen Uterus und Vagina eine etwa gleich große Affinität zum Östradiol. Dies stimmt mit den Befunden von Terenius für Inkubationen mit Gewebe infantiler Mäuse überein (Lit.69). Das Ovar (6,5%, alle Angaben in %/10mg Gewebe) hat eine größere, Leber (1,9% bei 17aT- und 3,5% bei 6,7T-Östradiol) und Diaphragma (1,8-2,5%) eine geringere Affinität zum Östradiol (Abb.14).

Bestimmt man aus den Inkubationsüberständen den HTO-Anteil, so ergeben sich für die verschiedenen Gewebearten unterschiedliche Anteile.

Inkubationen infantilen Uterusgewebes mit 17aT-Östradiol ergeben eine Oxidation zu HTO um 4%, während aus 6,7T-Östradiol erwartungsgemäß kein HTO gebildet wird (<0,2%). Inkubationen mit Ovar und Diaphragma ergaben in keinem Fall HTO-Anteile (<1%). Für die Leber wurden aus den Inkubationen mit "labil"-markiertem Molekül 9% HTO ermittelt, während aus 6,7T-Östradiol kein HTO entstanden war (Abb.15).

Wenn man die verschiedenen Organe mit 17aT-Androsten-17ol und 7aT-Androsten-17ol inkubiert, so ergibt sich folgendes Bild: Der Einbau in Uterusgewebe betrug 8-10%, in Ovar und Vagina um 4% aus 17aT-Androsten-17ol. Die Leber zeigt eine dem Östradiol vergleichbare Affinität zu Androsten-17ol, "stabil"- zu "labil"-markiertes Molekül werden wie 2:1 eingebaut. Das Diaphragma dagegen zeigt einen Einbau von Androsten-17ol um 2,8%.

Mit 7aT-Androsten-17ol wird im Uterus erwartungsgemäß kein HTO gebildet, bei der Inkubation mit 17aT-Androsten-17ol wird nur in der Leber etwa 6% HTO gebildet, während in den übrigen Organen weniger als 1,5% HTO gebildet wird.

Die Versuche in diesem Abschnitt wurden sämtlich bei vergleichbaren Konzentrationen an Androsten-17ol und Östradiol durchgeführt (Vergleiche Angaben in Abb. 12,14,15).

Die HTO-Bildung in der Leber stimmt größenordnungsmäßig mit den Angaben, die in 3.1.1.b gemacht wurden, überein, wenn man auf gleiche Inkubationszeiten umrechnet.

3.2.2. In welcher chemischen Form liegt Androsten-17ol im Uterus vor?

Da 17aT- und 7aT-Androsten-17ol gleichermaßen in den Uterus eingebaut werden, ist indirekt bereits bewiesen, daß es sich um das nicht an C-17 oxidierte Molekül handeln muß, das vom Gewebe aufgenommen wurde. Durch DC-Analyse soll jedoch der Nachweis erbracht werden, daß es sich tatsächlich um den Einbau des Gesamtmoleküls handelt.

Hierzu wurde nach der Inkubation der Uteri mit 17aT- und 7aT-Androsten-17ol jeweils das Gewebe verschiedener Ansätze vereinigt. Nach der üblichen Nachinkubation mit inaktivem Material wurden die Steroide mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch unter dem Scanner analysiert. Bei beiden Steroiden ergab sich ein identisches Maximum, das dem Androsten-17ol entspricht.

Nach dem Auswaschen des Überschusses an radioaktivem Östradiol war nachweisbar, daß mit 17aT-Östradiol die nicht auswaschbare Tritium-Aufnahme im Gesamtuterus fast doppelt so groß ist wie bei Inkubationen mit 6,7T-Östradiol, obwohl aus 17aT-Östradiol möglicherweise HTO entstehen kann, das den Uterus wieder verläßt (Lit.14).

Dieser Nachweis konnte für Androsten-17ol nicht erbracht werden. Dennoch sollte eine chemische Fraktionierung der Uteri eine eindeutige Aussage über die Gleichartigkeit der Tritium-Aufnahme aus 17aT- und 7aT-Androsten-17ol zeigen.

Nach Abb.16 sieht die Aktivitätsverteilung nach Fraktionieren des Uterusgewebes wie folgt aus: 17aT- und 6,7T-Östradiol werden etwa gleich stark in die Lipoide eingebaut (3,8 und 3,2%/10mg). Der Einbau in die Nucleinsäure- und Proteinfraktion war insgesamt sehr gering (0,5-3 x 10^{-2}%/10mg). Auffällig ist der bevorzugte Einbau von Aktivität aus "labil"-markiertem Molekül in alle Fraktionen des Uterus.

Bei Inkubationen mit 17aT- und 7aT-Androsten-17ol fand sich die Aktivität aus beiden Markierungsarten in der Lipoidfraktion wieder, der Einbau in die Nucleinsäure- und Proteinfraktion war in jedem Fall gering.

Hieraus ergibt sich, daß Androsten-17ol im Uterus nicht oxidiert werden kann, wie das für Östradiol durch Jütting (Lit.12) und Lehmann (Lit.13) entgegen den Befunden von Jensen (Lit.11) postuliert wurde.

Eine eindeutige Bevorzugung des Tritium-Einbaus in die Nucleinsäuren aus 17aT-Östradiol im Vergleich zu 6,7T-Östradiol konnte allerdings auch hier nicht gefunden werden. Die Befunde von Wenzel et al., die eine in vitro-Bevorzugung des Perchlorsäureextraktes mit u.a. Nucleotiden und Nucleinsäuren (Faktor 90) bewiesen und daraus den Schluß der Oxidation des Östradiol an C-17 zogen, konnten nicht realisiert werden.

Auffällig ist jedoch die eindeutige Proteinbindung des Östradiol bei beiden Markierungsarten (3,0-3,45 x 10^{-2}%/10mg) im Unterschied zur fehlenden Bindung des Androsten-17ol (0,1-0,2 x 10^{-2}%/10mg). Beide Zahlen sind vergleichbar, da unter identischen Arbeitsmethoden mit gleichen Steroidkonzentrationen gearbeitet wurde und die Aktivitätswiederfindung nur bei Östradiol sich deutlich vom Nullwert des Androsten-17ol-Einbaus unterschied. Der Einbau in die Nucleinsäuren bringt dagegen nur eine geringe Un-

terscheidung der Aktivitäten aus Östradiol und Androsten-17ol.

3.2.3. Vergleich der Uterusbindung verschiedener Steroide

Um die Sonderstellung des Androsten-17ol im Hinblick auf den Aktivitätseinbau in den Uterus weiter zu festigen, wurden neben Östradiol auch noch andere Steroide zum Vergleich herangezogen.

Da im Uterus keine Oxidation des Östradiol und Androsten-17ol an C-17 gefunden wurde, kann man erwarten, daß auch andere 17-OH-Steroide im Uterus nicht oxidiert werden. Deswegen kann man durchaus mit 1,2-T-Testosteron und 4,5,6-T-5a-Androstan-3,17-dion inkubieren, um die Uterusaffinität solcher androgenen Steroide zu ermitteln.

Während bei Inkubationen mit Androst-3-en-17ol, Androst-2-en-17ol und Östradiol die Gewebeaffinität dieser Steroide wieder ebenso groß war, wie oben bereits beschrieben, sah die Gewebeaffinität bei Inkubationen mit den beiden anderen Steroiden anders aus.

Inkubationen mit 4,5,6-T-5a-Androstan-3,17-dion ergaben einen Tritium-Einbau in den Uterus unter 0,1% der eingesetzten Aktivität (Abb.17), wogegen der Einbau in Diaphragma und Leber dem Einbau der anderen Steroide vergleichbar war (Abb.14).

Wird mit 1,2-T-Testosteron inkubiert, so ergibt sich keinerlei Affinität zu Uterus (Abb.17) und Diaphragma (<0,2%), eine größere Affinität zur Leber (1,5%) und zum Ovar (2,0%) (Abb.14).

6,7-T-Östron wird zu 0,8% an das Uterusgewebe gebunden, im Vergleich zu 2,5% aus 6,7-T-Östradiol. Das stimmt mit den in vivo-Befunden von Jensen (Lit.48) überein, der dem Östron eine geringe Bindungskapazität zum Uterus zuspricht. 7aT-Androsten-17on dagegen wird in vitro zu 8% an den Uterus gebunden.

Aus diesen Ergebnissen kann man den Schluß ziehen,

daß Androsten-17ol eine ganz besondere Affinität zum uterinen Gewebe hat. Im Vergleich mit den C-19-Steroiden Testosteron und Androstandion nimmt Androsten-17ol eine Sonderstellung ein. Diese besonders große Uterusaffinität ist folglich kein Befund, der für alle anderen C-19-Steroide zutrifft.

3.2.4. Konzentrationsabhängigkeit des Tritium-Einbaus

Bei Untersuchungen über die Gewebeaffinität von Steroiden werden Steroid-Konzentrationen im physiologischen Bereich eingesetzt. Das bedeutet z.B. für Östradiol eine Konzentration im Bereich von 10^{-9}Mol/l (Lit.68). Überschreitet man nach Terenius (Lit.69) diesen physiologischen Bereich um nur eine Zehnerpotenz, so sinkt der prozentuale Einbau des Östradiol von 4% auf 0,8% der eingesetzten Menge. Bei Inkubationen mit Androsten-17ol hingegen ist der prozentuale Tritium-Einbau noch steigerbar von 8% auf 12% und sinkt erst beim Überschreiten zweier Zehnerpotenzen deutlich ab (6%, Angaben in %/10mg Gewebe). Demnach hat der Uterus nur eine begrenzte Kapazität für Östradiol (Rezeptor-Kapazität), nicht dagegen für Androsten-17ol.

Man muß hierbei berücksichtigen, daß bei der Aktivitätswiederfindung die genannten %-Zahlen auf die jeweils unterschiedlich eingesetzten Steroidmengen bezogen sind. Transformiert man die Zahlen aus Abb.18 in ein Koordinatensystem, das auf der Abszisse logarithmisch die eingesetzten Mol/l Steroid und auf der Ordinate die tatsächlich gefundenen Mol/10mg Gewebe darstellt, so ergibt sich ein noch deutlicheres Bild (Abb.19). Beim Einsatz von 10^{-10}Mol/l Androsten-17ol werden 2,6 x 10^{-14}Mol/10mg im Uterus gebunden, bei 10^{-7}Mol/l 1900 x 10^{-14}Mol/10mg. Bedeutend flacher verläuft die Kurve bei Östradiol-Inkubationen: 10^{-10}Mol/l lassen 1,26 x 10^{-14} Mol/10mg, 10^{-7}Mol/l lassen 130 x 10^{-14}Mol/10mg wiederfinden. Das heißt Androsten-17ol hat beim Einsatz von 10^{-7}Mol/l

eine etwa 10-fach höhere Affinität zum Rattenuterus als Östradiol.

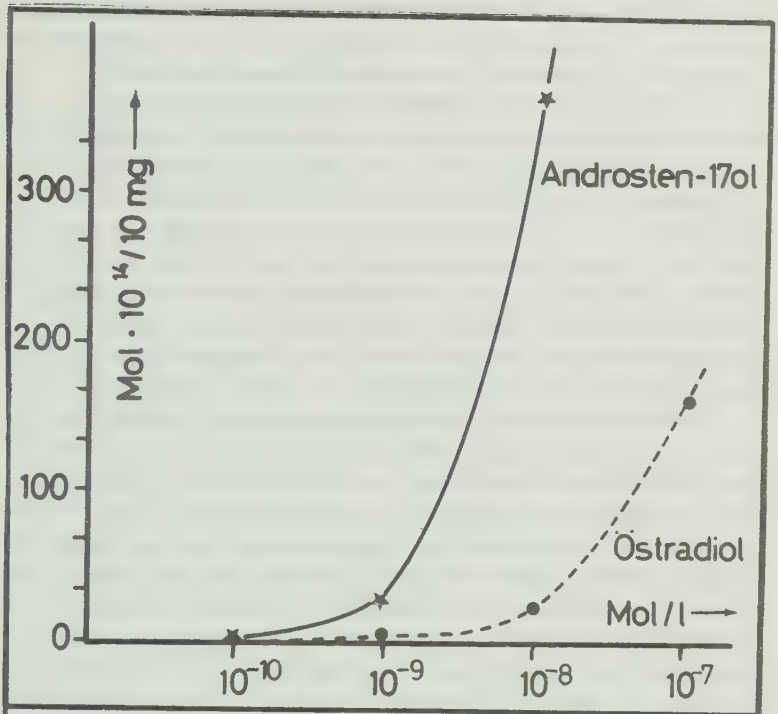


Abb. 19 Konzentrationsabhängigkeit der Uterusbindung

Tritium-Einbau aus 17aT-Androsten-17ol und 17aT-Östradiol in infantiles Gewebe.
Werte aus Abb.18 übertragen.
Ordinate: Mol x 10^{14}/10mg Gewebe
Ordinatenpunkt für Androsten-17ol bei 10^{-7} Mol/l nicht dargestellt (1900 x 10^{-14} Mol/10mg).

Wenn man also die Steroidkonzentrationen weiter erhöht, so erhält man stets eine größere Hormon-Menge im Uterus. Diese "Bindung" (phys.chem. Verteilung) ist jedoch unspezifisch und ist dann auch in hormonell nicht gesteuerten Organen anzutreffen.

Serumalbumin besitzt unter den Serumproteinen die höchste Affinität zum Östradiol (Lit.70) und dient im Blut als Träger des Östradiols (Lit.71). Eine Konkurrenz zwischen Uterusgewebe und Serumalbumin trifft auch für Östradiol zu. Gibt man den Inkubationsansätzen wie Terenius (Lit.72) einen Überschuß an Albumin hinzu, so wird die Bindung an Uterusgewebe auf 20% der ursprünglichen Werte herabgedrückt (Abb.20). Dies gilt ebenso für Androsten-17ol, denn hier werden nur 40% des ursprünglich an Uterusgewebe gebundenen Steroids bei Zugabe von Albumin wiedergefunden. Es stellt sich aber heraus, daß trotz Zugabe von Albumin, die Uterusbindung von Androsten-17ol und Östradiol sich wie 2:1 verhält. Der ohnehin schon geringe Einbau von Testosteron wird durch Albumin total unterbunden.

Auch die Bindung an das Diaphragma wird vermindert und beträgt nach Zugabe von Albumin nur noch 50% der ursprünglich inkorporierten Aktivität, sowohl beim Östradiol als auch beim Androsten-17ol (Abb.20).

Die unvergleichbar hohen Einbauraten von Androsten-17ol legten den Verdacht nahe, daß eventuell durch ein zu hohes Steroidangebot bereits bei 10^{-9}Mol/l die Tritium-Aufnahme durch Überschreiten der physiologischen Konzentration unspezifisch sein könnte.

Ein Versuch mit Konzentrationen im Bereich von 10^{-10} Mol/l bewies das Gegenteil. Sowohl aus Östradiol als auch aus Androsten-17ol blieben die prozentualen Einbauraten unverändert gleich hoch (Abb.18). Das Bindungsverhältnis Androsten-17ol/Östradiol ist auch in diesem Konzentrationsbereich wie 2:1.

3.2.5. Hemmung der Uterusbindung

Für das Zustandekommen der Östradiolbindung zum Uterus diskutiert man das Vorhandensein von Hormonrezeptoren in den Zielorganen. Es muß möglich sein, diese Uterus-Rezeptorbindung mit Substanzen zu unterbinden, die ebenfalls

eine hohe Bindungskapazität zu diesen Rezeptoren haben. Der Hauptteil der Bindungskapazität wird dann von der jeweils zugesetzten Substanz durch kompetitive Verdrängung des Östradiol in Anspruch genommen.

In diesem Abschnitt soll geprüft werden, ob für die Bindung des Androsten-17ol das gleiche gilt. Es soll festgestellt werden, ob zwischen beiden Substanzen eine Parallelität der Art der Bindung an das Erfolgsorgan des Östradiol besteht, oder ob das nicht der Fall ist (Abb.21,22).

Östradiol und Diäthylstilböstrol

Der Tritium-Einbau aus 17aT-Östradiol in den Uterus infantiler Ratten läßt sich durch Zugabe von Diäthylstilböstrol um 60% oder durch Zugabe eines Überschusses an inaktivem Östradiol um 70% hemmen (Abb.21). Inkubiert man 17aT-Androsten-17ol jeweils mit Diäthylstilböstrol oder einem Überschuß von inaktivem Östradiol, so unterbleibt hier eine Hemmung des Aktivitätseinbaus in das Gewebe des Uterus völlig: Androsten-17ol wird unvermindert stark gebunden (Abb.22).

Hier wird deutlich, daß man die Östradiol-Bindung mit einem Überschuß an östrogenen Substanzen reduzieren kann. Eine Kontrolle des tatsächlichen Ausmaßes der Bindung der konkurrierenden Östrogene an den Uterus ist nur indirekt möglich. Dadurch, daß sich der Einbau an Tritium-markiertem Östradiol in vitro vermindert, zeigt sich, daß auch zum Beispiel Diäthylstilböstrol gebunden werden muß, da es kompetitiv aktives Östradiol verdrängt hat.

Auf der anderen Seite sind Östrogene nicht in der Lage, das C-19-Steroid Androsten-17ol kompetitiv in vitro zu verdrängen. Die Bindung des Androsten-17ol muß also hier auf einem anderen Mechanismus beruhen, sonst wäre auch hier eine Verminderung der Bindung möglich.

Antiöstrogene

Nach Terenius (Lit.66) blockieren einige sog. Antiöstrogene die Bindung des Östradiol zu bestimmten Bindungsorten im Uterus. Jedoch haben alle diesbezüglichen Antiöstrogene ebenfalls eine östrogene Wirkung. Die verschiedenen Antiöstrogene wie Meso-Hexöstrol, U-11100 A, Meso-Butöstrol und Clomiphen sind in der Lage, die Uterusbindung von Östradiol zu inhibieren. Auch andere östrogenabhängige Vorgänge werden antagonisiert. Nach Bloom et al. (Lit.73) z.B. wird das Wachstum der Tumoren der Hamsterniere oder das Wachstum Dimethylbenzanthracen-induzierter Mamma-Tumore nach Terenius (unveröffentlicht) mit U-11100 A gehemmt. Der therapeutische Nutzen dieser Antiöstrogene ist dennoch zweifelhaft, wenn man ihre Östrogenität berücksichtigt.

Der Tritium-Einbau in den Uterus aus 17aT-Östradiol war durch eine Substanz dieser Wirkstoffgruppe - durch U-11100 A - auch nach eigenen Versuchen um 60-70% zu hemmen (Abb.21). Der Einbau von 6,7-T-Östradiol wurde zu 75% gehemmt. Der Einbau aus 17aT-Androsten-17ol war nur in geringem Maße zu 20% zu hemmen (Abb.22).

Dieses Beispiel zeigt ebenfalls, daß die Uterusbindung des Androsten-17ol eine andere sein muß als die des Östradiol.

Actinomycin D, Puromycin, p-Chlormercuribenzoat

Antibiotika wie Actinomycin D und Puromycin inhibieren Prozesse zur Proteinsynthese der Zelle bei verschiedenen Reaktionsschritten. Actinomycin D hemmt die DNS-Ablesung, während Puromycin die Eiweiß-Synthese hemmt. (Genaueres siehe Diskussion.) Diese Antibiotika verhindern also auch das Östrogen-induzierte Uteruswachstum. Sie hemmen jedoch nicht die Uterus-Bindung des Östradiol (Lit.74).

Nach Wenzel (Lit.14) ergab sich, daß bei Inkubatio-

nen der Uteri infantiler Ratten mit physiologischen Konzentrationen von Östradiol der an C-17 gebundene Wasserstoff des Östradiols in den Uterus stärker eingebaut wird als das Kohlenstoff-Skelett des Östradiol selbst. Danach ergab sich ein erhöhter Tritium-Einbau aus 17aT Östradiol in die Nucleinsäure-Fraktion des Uterus im Vergleich zum Tritium-Einbau aus 6,7-T-Östradiol. Dieses Ergebnis konnte wie oben bereits beschrieben durch eigene Versuche nicht gefunden werden.

In Lit.75 wurde eine deutliche Hemmung des Tritium-Einbaus aus 17aT-Östradiol durch Actinomycin D in die Nucleinsäuren gezeigt. Da jedoch nach eigenen Befunden die Tritium-Aktivität in der Nucleinsäure-Fraktion nur einen verschwindenden Anteil an der T-Aktivität im Gesamtuterus ausmacht, ist nicht zu erwarten, daß man mit Actinomycin D und Puromycin eine Auswirkung auf die T-Aufnahme in den Gesamtuterus erreicht.

Dennoch zeigten eigene Versuche (Abb.21) mit den Antibiotika Actinomycin D und Puromycin eine Verminderung der Tritium-Aufnahme in den Gesamtuterus bei der Inkubation mit 17aT-Östradiol um 50-60% der Kontrollwerte.Eine Deutung dieses Befundes ist gegenwärtig nicht möglich, denn er steht auch im Gegensatz zu den in vivo-Befunden von Jensen (Lit.68), der keine Beeinflussung der Inkorporation von Östradiol in den Uterus bei gleichzeitiger Applikation der beiden Antibiotika gefunden hatte.

Gibt man den Inkubationsansätzen mit 17aT-Androsten-17ol die oben erwähnten Antibiotika hinzu, so wird der Tritium-Einbau in das Gewebe nur geringfügig gehemmt (Abb.22).

Die charakteristische Fähigkeit des Uterus der Ratte, Östradiol in vivo und in vitro zu inkorporieren, kann auch dadurch inhibiert werden, daß man das Gewebe mit verschiedenen Sulfhydrylgruppen-blockierenden Reagentien behandelt. Nach Jensen (Lit.76) spielen Sulfhydrylgruppen der Uterus-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Östra-

diol-Bindung, vielleicht sogar indirekt durch ihre Mitwirkung bei der Bildung der Rezeptoren.

Inkubationen mit p-Chlormercuribenzoat hemmen den Tritium-Einbau aus 17aT-Östradiol um 25% gegenüber den Kontrollwerten. Der T-Einbau aus 17aT-Androsten-17ol wird auf diese Weise nicht gehemmt. Die Bindung des Androsten-17ol erfolgt demnach sicherlich nicht über SH-Gruppen.

Testosteron, Androsten-17ol, Östradiol

Nach Terenius (Lit.77) ist Testosteron in 10^{-5}-10^{-4} Mol/l in der Lage, die Bindung des Östradiol an Uterus und Vagina in vitro zu reduzieren, während Progesteron und Hydrocortison in denselben Konzentrationen keinen Effekt zeigen.

Nach eigenen Befunden hemmt Testosteron (10^{-6}Mol/l) den Tritium-Einbau aus 17aT-Östradiol um 60%, nicht aber den Tritium-Einbau aus 17aT-Androsten-17ol. Inkubiert man jedoch 17aT-Östradiol mit 10^{-7}-10^{-5}Mol/l Androsten-17ol inaktiv, so zeigt sich, daß der Tritium-Einbau um 60-70% gehemmt wird (Abb.21,22).

Dieses Ergebnis zeigt einerseits, daß sowohl Testosteron als auch Androsten-17ol in der Lage ist, die Uterusbindung des Östradiol erheblich zu inhibieren. Man kann dies durch eine Verdrängung am Rezeptor interpretieren. Andererseits ist Testosteron nicht in der Lage, den Einbau von Androsten-17ol zu hemmen. Eine Interpretation ist hier nur möglich, wenn man annimmt, daß weder Androsten-17ol noch Testosteron an den Rezeptor des Uterus gebunden werden und der "Einbau" nur durch eine gute Lipoidlöslichkeit beider Steroide zustandekommt.

3.3. Endokrinologische Wirkungen von Androsten-17ol/on bei Ratten und Mäusen

3.3.1. Östrogene Wirkung

Die im Vergleich zum Östradiol sehr große Affinität des Androsten-17ol zum Uterus der Ratte in vitro, ließ evtl. eine östrogene Wirkung vermuten. Allerdings spricht dagegen die fehlende Anreicherung in vivo.

Um diesen Gegensatz der biochemischen Befunde zu deuten, sollten biologische Versuche eine Klärung herbeiführen. Ein Östrogentest sollte eine Parallelität oder aber eine Unterschiedlichkeit der Bindungen von Östradiol und Androsten-17ol zum Gewebe des Uterus in biologischer Hinsicht zeigen. Hierzu wurde Androsten-17ol auf eine mögliche östrogene Wirkung nach Allen/Doisy (Lit.78) getestet.

Nach diesem Versuch ergab sich kein positiver Befund, wie er bei der Behandlung mit östrogenen Substanzen üblich ist (Tab.5). Die kastrierten Rattenweibchen befanden sich weiter im Diöstrus und waren trotz hoher Androsten-17ol-Gaben nicht in einen östrusartigen Zustand versetzt worden.

Tab. 5 Östrogen-Test nach Allen-Doisy

Je 6 kastrierten Rattenweibchen wurden 10mg Androsten-17ol und 10mg Androsten-17on s.c. injiziert (Östradiol-Angaben wurden der Literatur entnommen). Nach den angegebenen Zeiten wurden die Zyklusstadien bestimmt und der Östrus als positiv (+) oder negativ (-) klassifiziert (Näheres siehe Methodik).

Substanz	Cytologischer Befund nach Steroid-Inj. 72 h	77 h	96 h	120 h
Androsten-17ol	-	-	-	-
Androsten-17on	-	-	-	-
Östradiol	+	+	+	+

Da die 17-OH-Verbindung nicht östrogen war, ist auch keine östrogene Wirkung des 17-Ketons zu erwarten, weil ganz allgemein die biologische Wirkung der 17-Ketosteroide geringer ist als die der 17-OH-Steroide.- Die hohen Einbauraten in den Uterus nach Abb.12 sind ganz unabhängig von einer östrogenen oder nicht-östrogenen Wirkung des Androsten-17ol.

Dagegen muß die östrogene Wirkung des Östradiol weitere Folgen haben als nur den Einbau des Östrogens in Uterus. Die östrogene Wirkung muß also durch Folgereaktionen eines sogenannten Aufnahmeprozesses ausgelöst werden, was gut mit Vermutungen der Literatur über die östrogenauslösenden Effekte übereinstimmt.

3.3.2. Antiöstrogene Wirkung

Androsten-17ol

Da Androsten-17ol in vitro in der Lage war, den Östradiol-Einbau in den Uterus zu hemmen (Abb.21), konnte man einen biologischen Antagonismus erwarten. Ein Antiöstrogentest sollte klären, ob dieser in vitro-Befund eine Parallelität in biologischer Hinsicht hat.

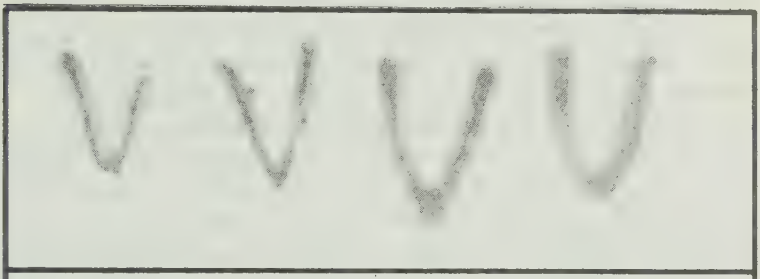
Dazu wurde der Antiöstrogentest nach Dorfmann modifiziert nach Kessler (Lit.79,80) durchgeführt.

Danach reagiert der Uterus von Nagern auf wirksame Östrogene mit Wachstum. Wirksame Antiöstrogene vermögen das Östrogen-induzierte Uteruswachstum zu hemmen.

Die Uterusgewichte nach dreitägiger Gabe der Testsubstanzen sind in Abb.24 wiedergegeben. Als Kontrollsubstanz erhielten die Tiere 0,1µg Östron subcutan injiziert.

Bei mit Östron behandelten Tieren stieg danach das Uteruswachstum auf das 4,5-fache ohne Sekret und auf das 5,8-fache mit Sekret der Kontrolltiere an, was gut mit den Befunden aus der Literatur übereinstimmt (Lit.64,65). Applizierte man jedoch gleichzeitig mit dem Östrogen 1mg

Androsten-17ol, so resultierte nur ein Anstieg der Uterusgewichte um das Doppelte der Kontrolltiere, während unter Androsten-17ol-Einfluß allein das Gewicht auf das 1,5-fache anstieg (Vergleiche auch Abb.23).



A B C

Abb. 23 Uteruswachstum infantiler Ratten nach Injektion von Östron und Androst-3-en-17-ol

A : Uterus unbehandelter Tiere
B : Uterus nach Injektion von 1 mg Androst-3-en-17-ol + 0,1µg Östron
C : Uterus nach Injektion von 0,1µg Östron
Bedingungen siehe Methodik.

Diese Befunde zeigen eine antiöstrogene Wirkung des Androsten-17ol. Es erschien hierbei noch der Aspekt des Schwellenwertes für die Androsten-17ol-Menge interessant, die noch ausreicht, eine deutliche antiöstrogene Wirkung zu erzielen. Hierzu wurden 0,1µg Östron 0,1mg Androsten-17ol entgegengesetzt. Diese Menge reichte allerdings nicht mehr aus, das Uteruswachstum zu beeinflussen.

Androsten-17on

Nach Wenzel und Mützel (Lit.4) ist Androsten-17on in der Lage, in vitro und in vivo die Oxidation von Östradiol zu Östron zu beschleunigen. Dieser biochemische Befund läßt auch eine antiöstrogene Wirkung des 17-Ketosteroids erwarten, die aber dann nicht auf der Konkurrenz um Östrogen-Rezeptoren beruhen dürfte, sondern auf dem

Wasserstoff-Transfer zwischen Östradiol und Androsten-17on. Da das dabei gebildete Östron eine geringere biologische Wirkung besitzt, dürfte mit Androsten-17on solch eine Inaktivierung des Östradiol in bezug auf das Uteruswachstum zu erzielen sein.

Da bei diesem Antiöstrogentest jedoch Östron verwandt wird, um die biologische Wirkung - das Uteruswachstum - zu stimulieren, und da man dem Östron selbst nur eine geringe biologische Wirkung zuspricht, muß man annehmen, daß es im intermediären Stoffwechsel zu Östradiol reduziert wird. Nur in dieser Form löst es das vermehrte Uteruswachstum aus. Erst unter dieser Voraussetzung kann man evtl. damit rechnen, daß Androsten-17on das Uteruswachstum hemmt.

Wie Abb.25 zeigt, steigt das Uteruswachstum bei Gabe von 1mg Androsten-17on unverändert um das 4-5-fache, wenn man mit Östron stimuliert. In dieser Größenordnung ist also keine antiöstrogene Wirkung zu erkennen.

Die Erhöhung der Dosis um das 3-fache führt jedoch zu einem geringen Effekt: Das Uteruswachstum wird um 15% gehemmt.

Hieraus ergibt sich, daß eine antiöstrogene Wirkung auf grund des Wasserstoff-Transfers zwischen Östradiol und Androsten-17on so gering sein muß, daß sie einem Vergleich mit der Wirkung durch eine mögliche Konkurrenz um die Rezeptoren des Östradiol durch Androsten-17ol nicht standhält. Eine weitere Dosiserhöhung zur Erzielung eines sich hieraus ergebenden therapeutischen Effektes erscheint im übrigen sehr fragwürdig, denn man sollte grundsätzlich anstreben, Pharmaka in möglichst niedrigen Dosierungen zur Wirkung zu bringen.

Diäthylstilböstrol

Nimmt man für die östrogene Wirkung des Östradiol auf das Uteruswachstum einen Wirkungsmechanismus über die Hormonrezeptoren des Uterus an, so gilt dies für Diäthyl-

stilböstrol in besonderem Maße, weil hier keine Oxidation an C-17 erfolgen kann. Sollte also Androsten-17ol auch bei Diäthylstilböstrol-Gabe antiöstrogen wirken, so kann der Einfluß von Androsten-17ol nicht über einen Einfluß auf die Sauerstoff-Funktion an C-17 erfolgen, sondern nur über einen Mechanismus, der die Östrogen-Aufnahme am Zielorgan verhindert.

0,1µg Diäthylstilböstrol bewirkte ein größeres Uteruswachstum (Abb.26) als die gleiche Menge Östron (Abb.24). Der Einfluß von Androsten-17ol ist jedoch geringer (35% Hemmung) als bei Induktion durch Östron. Die Applikation von 3µg Diäthylstilböstrol bewirkte ein fast doppelt so großes Uteruswachstum wie die Gabe von 0,1µg Östron. Androsten-17ol inhibiert hier das Uteruswachstum nicht. (In Abb.26 nicht dargestellt).

Diese Befunde erhärten die Vermutung, daß der Einfluß von Androsten-17ol nicht über eine Veränderung an C-17 des Östradiol abläuft, sondern seine Wirkung über einen Rezeptor-Mechanismus entfaltet, was in diesem Fall mit Vermutungen von Terenius übereinstimmt, der einen solchen Wirkungsmechanismus von Östrogen-Antagonisten annimmt.

3.3.3. Androgene und anabole Wirkung

Um die vorliegenden Befunde im Hinblick auf eine mögliche hormonale Therapie östrogenabhängiger Vorgänge werten zu können, sollte auch die androgen-anabole Wirkung des Androsten-17ol getestet werden. Eine östrogene Wirkung ist nach 3.3.1. auszuschließen, eine androgene Wirkung könnte jedoch den möglichen therapeutischen Nutzen in Frage stellen.

Ein Test von Androsten-17on im Samenblasen-/Levator ani-Test durch die Schering AG verlief negativ, während 10mg des 17ß-Acetoxy-5a-Androst-3-en etwa der androgenen Wirkung von 1mg Testosteronpropionat entsprachen. Dieser Befund ließ evtl. auch eine androgene Wirkung der freien

17-Hydroxy-Verbindung erwarten. Die biologischen Grundlagen dieses Versuches sind folgende:

Die Funktion und Größe der accessorischen Geschlechtsdrüsen (Samenblase, Prostata) und des M. levator ani (eines Muskels des Perinealmuskelkomplexes) sind abhängig von der Anwesenheit von Androgenen. Wirksame Androgene führen bei kastrierten Tieren zu einem Wachstum dieser Organe. Der Test ist für Androgene spezifisch, die Verwendung des M.levator ani als Maß der anabolen Wirkung ist umstritten.

Das Gewicht der Samenblase steigt bei der Applikation von 1mg Testosteronpropionat um das 100-fache der Kontrolle. Eine 3-fache Androsten-17ol-Dosis bewirkt dagegen nur eine Steigerung um das 10-fache.

Für die Prostata ergibt sich ein ähnliches Bild. 1mg Testosteronpropionat steigert ihr Gewicht um das 30-fache, Androsten-17ol-Dosen von 3mg steigern ihr Gewicht nur um das 7-fache.

Wenn man also berücksichtigt, daß Androsten-17ol in der dreifachen Konzentration des Testosteronpropionats appliziert wurde, so wird deutlich, daß Androsten-17ol nur schwach androgen wirkt (Abb.27). Testosteronpropionat dagegen ist eine stark androgene Substanz.

Für die anabole Wirkung ergibt sich ein anderes Bild. Testosteronpropionat steigert das Gewicht des M. levator ani um das 3-fache der Kontrolle, Androsten-17ol um das 2,5-fache. Berücksichtigt man die unterschiedliche Dosierung, so ergibt sich immer noch eine relativ stärkere anabole Wirkung für das Testosteronpropionat im Vergleich zur Wirkung des Androsten-17ol.

Neben den absoluten Zahlen werden die relativen Wirkungen angegeben (Berechnung s. Methodik). Ohne Berücksichtigung der unterschiedlichen Dosis, ergibt sich zwischen anaboler und androgener Wirkung des Androsten-17ol nach der Formel Q = relative anabole Wirkung / relative androgene Wirkung ein Quotient von 6,7 (Lit.81). Dabei gilt, daß die Wirkung in Richtung anabol desto günstiger

ist, je größer Q ist (also die Dissoziation zwischen anaboler und androgener Wirkung).

Abschließend kann man also feststellen, daß es sich bei Androsten-17ol um eine schwach androgen wirksame Substanz handelt, deren anabole Wirkung noch der des Testosteronpropionats unterlegen ist. Wenn man die Dissoziation im Wachstum der accessorischen Geschlechtsdrüsen einerseits und des Levator ani andererseits bewertet, so kann man sagen, daß Androsten-17ol eher anabol als androgen wirkt.

4. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, den Weg des C-17-Wasserstoffs von Androsten-17ol zu untersuchen. Neben dem Verhalten eines solchen biologisch inaktiven Steroids, des Androsten-17ol, in Stoffwechselorganen interessierte vor allem die Frage nach der Wirkung des Androsten-17ol im Erfolgsorgan des Östradiol, dem Uterus. Dabei interessierte die Beeinflussung des Stoffwechsels von Androsten-17ol im Uterus und die Bindung des Steroids zum Uterus. Daraus leitete sich die Frage ab, ob Androsten-17ol auch die Bindung des Östradiol zu seinem Zielorgan beeinflussen kann.

Diese biochemischen Untersuchungen ergaben schließlich die Frage nach der direkten endokrinologischen Wirkung des Androsten-17ol einerseits und der indirekten Beeinflussung der Östradiol-Wirkung durch Androsten-17ol andererseits.

Enzymcharakterisierung des T-Transfers

Als Ursache für die Spezifität der Wasserstoff-Übertragung zwischen Androsten-17ol und Östron nehmen wir an, daß 17aT-Androsten-17ol durch eine unspezifische 17ß-OH-Steroid-Dehydrogenase unter NADT- bzw. NADPT-Bildung oxidiert wird, und daß das gleiche Enzymprotein vor der Abdissoziation der reduzierten Coenzyme mit Östron reagiert und somit Tritium-markiertes Östradiol bildet (Lit.83). Dieser Reaktionsschritt wurde bereits beschrieben, ebenso wie für den Wasserstoff-Transfer von 17aT-Östradiol auf Androstendion unter Bildung von 17aT-Testosteron eine entsprechende Interpretation wahrscheinlich gemacht wurde (Lit.60).

Hier wurde ein weiteres Beispiel für die enge Kopplung der Oxido-Reduktion eines Hydroxysteroids mit der Oxido-Reduktion eines zweiten Hydroxysteroids gefunden.

Die übrigen Befunde beweisen, daß zur Tritium-Übertragung von Androsten-17ol auf Östron Enzyme oder Enzymsysteme nötig sind. Das pH-Optimum des Tritium-Transfers auf Östron liegt bei 7,3 (Abb.2). Bei diesem pH-Wert wird bevorzugt Östradiol gebildet, im Vergleich zur unspezifischen HTO-Bildung. Wie in Lit.83 beschrieben überträgt auch im vorliegenden System 17aT-Androsten-17ol nur in Anwesenheit von NAD, NADP sein Tritium auf Östron. (Abb.7).

Nach Lit.117 hatte man gefunden, daß bei C-19-Steroiden in den Testes von Meerschweinchen die 17-OH-Gruppe zur 17-Keto-Gruppe oxidiert wurde (am Beispiel: 5a-Androstan-3a,17ß-diol ⟶ Androstan-3a-ol-17on, 2% Oxidation). Im menschlichen Ovar wurde Östron in geringem Maße zu 17ß-Östradiol reduziert. Nach den eigenen Versuchen sollte die Oxidation des Androsten-17ol am Tritium-Transfer des von C-17 abgelösten Wasserstoffs auf Östron nachgewiesen werden. Der Uterus scheint demnach ebensowenig wie Ovar und Testis über Enzyme zu verfügen, die eine solche Reaktion katalysieren können (Abb.6).

Der Wasserstoff-Transfer läßt sich also nach der Aufgabenstellung dieser Arbeit nur in der Leber und in der Niere nachweisen. Jedoch ist der Anteil des Androsten-17ol-Wasserstoffs an der Reduktion des von uns als Akzeptor ausgewählten Östron in der Leber weitaus am größten.

Eine deutliche Sexualspezifität des Transfers in der Rattenleber ist nicht zu erkennen. Quantitative Aussagen fallen schwer, da in der Leber männlicher Ratten infolge von Hydroxylierungsreaktionen ein Nebenprodukt entsteht, das die prozentuale Wiederfindung des Akzeptormetaboliten Östradiol überdeckt.Die 17ß-OH-Steroid-Dehydrogenasen sind in männlichen und weiblichen Stoff-

wechselorganen Leber und Niere offenbar in gleichen Konzentrationen vorhanden, die jedoch, wie dieses Beispiel erneut zeigt, keine signifikante Substratspezifität besitzen.

Die Gewebespezifität stimmt weitgehend mit einer anderen Arbeit überein: Der Wasserstoff-Transfer von C-17 des Anabolikums Metenolon auf Östron unter Bildung von Östradiol wurde in Leberschnitten von Ratten bewiesen (Lit.84). Ähnliche Befunde ergaben sich auch aus dieser Arbeit.

Zur weiteren Charakterisierung einer Enzymreaktion sind die Konzentrationsverhältnisse des im Redoxverhältnis stehenden Steroidpaares Androsten-17ol und Östron wichtig. Bei kleinen Akzeptorkonzentrationen verläuft der Wasserstoff-Transfer bereits vollständig, denn jedes Wasserstoff-Atom, das durch die Oxidation des 17aT-Androsten-17ol frei wird, erscheint im vorliegenden Akzeptor Östron. Nur ein kleiner Teil erscheint als Wasser im Inkubationsüberstand. Mit steigender Östron-Konzentration bleibt nämlich der Anteil des reduzierten Akzeptors konstant, der Anteil des Donator-Wasserstoffs im Wasser bleibt ebenfalls konstant. Die relative spezifische Aktivität im gebildeten Östradiol, d.h. der Tritium-Anteil in der Gesamtmenge des Östradiol, muß hiernach sinken, denn der Bedarf an Reduktionsäquivalenten kann vom Tritium des Donators allein nicht mehr gedeckt werden.

In vitro konnte ein deutlicher Einfluß von Östron auf die Oxidation von Androsten-17ol festgestellt werden. Ohne Zugabe von Akzeptor wurde Androsten-17ol bereits zu 40% oxidiert, was an der Wiederfindung des Oxidationsproduktes Androsten-17on zu 40% erkennbar war. Unter dem Einfluß von Östron fanden sich diese 40% des von Androsten-17ol abgelösten Wasserstoffs im Akzeptor-Metaboliten Östradiol wieder. Jedoch konnte hier weniger Donator wiedergefunden werden, die Differenz der T-Aktivität fand sich im HTO wieder. Androsten-17ol war also vermehrt

oxidiert worden (Abb.4).

Hier wird deutlich, daß auch beim in dieser Arbeit verwandten Redox-Paar Androsten-17ol - Östron, in vitro eine erhöhte Oxidation des Donator-Steroids zu messen ist.

Wird die Donatorkonzentration erhöht, d.h. ist der Donator im Vergleich zum Akzeptor im Überschuß vorhanden, wird das Cytoplasma mit T-markierten Pyridinnucleotiden überschwemmt und wegen der im Verhältnis geringen umzusetzenden Östronmenge wird ein relativ guter Tritium-Einbau erzielt. Dieser Befund wird aus Abb.5 nicht sichtbar, weil dort der Anteil des Akzeptors an der eingesetzten prozentualen Donator-Aktivität dargestellt wird. Die prozentuale Wiederfindung des Donators erhöht sich dabei natürlich, während der Metabolit an der Gesamtaktivität weniger Anteil hat. Deutlich wird, daß erst bei einem äquimolaren Verhältnis Donator/Akzeptor das Gleichgewicht der Aktivitäten im Verhältnis 40/40 überschritten wird.

Die Oxidation des Androsten-17ol zu Androsten-17on wird unter dem Einfluß von Östron in weiblichen Ratten in vitro beschleunigt, unter dem Einfluß von Östradiol verlangsamt. Dies stimmt gut mit den Befunden der Östradiol-Oxidation überein. Bildet man nach Hertogh (Lit.85) wie auf Seite 27 den Quotienten der Redox-Partner Androsten-17ol und Androsten-17on (Abb.8), so wachsen die Quotienten bei Zugabe von Östradiol und sinken bei Zugabe von Östron. Qualitativ, nicht quantitativ, lassen sich die Ergebnisse mit der Östradiol-Oxidation vergleichen. Hier war der Quotient (Östradiol) : (Östron) ≈ 0,091. Bei Zugabe eines an C-17-reduzierten Steroids wie Testosteron und Androsten-17ol werden die Quotienten je nach Konzentration größer (0,3-0,85), bei Zugabe eines an C-17-oxidierten Steroids wie Androstendion und Androsten-17on werden die Quotienten kleiner (0,06-0,074) (Lit.86).

Bedeutung des T-Transfers

In Lebergewebe erhöht die Zugabe eines 17-Ketosteroids die Oxidation eines 17-OH-Steroids. Erklärbar ist das nur durch den hochspezifischen Wasserstoff-Transfer zwischen Steroiden in der Zelle. Die Verringerung der Oxidation bei 17-OH-Steroid-Zugabe beweist auf der anderen Seite, daß das oxidierende Enzym keine große Substratspezifität besitzt.

Die in vivo-Befunde bestätigen dies in gewisser Weise. Die Östradiol-Zugabe verlangsamt bei weiblichen Ratten erheblich (um ca.20%) die Androsten-17ol-Oxidation. Dies kann als echter Schutz der Androsten-17ol-Oxidation durch die Konkurrenz um dieselben Enzyme der Steroid-Dehydrogenasen mit Östradiol aufgefaßt werden. Allerdings verlangsamte hier die Zugabe von Östron die HTO-Bildung ebenfalls, also scheinbar die Oxidation. Da jedoch die Oxidation an der HTO-Ausbeute des Körperwassers gemessen wird, kann man nicht erkennen, welchen Weg das Tritium einschlägt, bevor ein Teil davon im Atemwasser sichtbar wird. Vermutlich ist hier im intermediären Stoffwechsel Östradiol entstanden, das seinerseits das Tritium für Syntheseleistungen bzw. Bindungen am Uterus zur Verfügung gestellt hat, oder aber durch den Kreislauf ausgeschleust worden ist (Vergl. Abb.10, Schema auf Seite 29 und anschließende Diskussion).

In männlichen Tieren wirkte Östron oxidationssteigernd auf Androsten-17ol in vivo. Hier wurde mehr HTO gebildet, weil das 17-Oxosteroid durch das Androsten-17ol reduziert wurde, und nun ebenfalls oxidiert werden kann. Wie bei weiblichen Tieren wirkt auch bei Männchen die Zugabe von Östradiol inhibierend auf die Androsten-17ol-Oxidation, vermutlich durch Konkurrenz um die OH-Steroid-Dehydrogenasen (Abb.9).

Wenn man die Oxidation von Androsten-17ol einerseits mit der Östradiol-Oxidation andererseits in infantilen und adulten weiblichen Tieren vergleicht, so

fällt auf, daß Androsten-17ol bei infantilen Weibchen bedeutend geringer (30% weniger) oxidiert wird als Östradiol (Abb.11). Dagegen ist bei beiden Steroiden die Oxidationsrate in erwachsenen weiblichen Tieren etwa gleich hoch. Eine mögliche Erklärung wäre, daß bei infantilen Tieren die 17ß-Östradiol-Dehydrogenase eine größere Substratspezifität besitzt als bei erwachsenen Tieren und daher Androsten-17ol schlechter oxidieren kann.

Bedeutung der Steroid-Bindung

Die in vitro-Inkubationen mit Androsten-17ol ergaben eine erstaunlich hohe Einbaurate von Radioaktivität in den Uterus im Vergleich zum Einbau aus Östradiol (Abb.12). Die Bedingungen nach Beaulieu (Lit.37) zum Zustandekommen einer spezifischen Hormon-Rezeptor-Bindung werden wie folgt erfüllt.

Soll die Konkurrenz durch Antagonisten eine Rolle spielen, so muß man voraussetzen, daß eine bestimmte Menge eines solchen Antagonisten die Bindung des Steroids zum Zielorgan blockieren kann. Man kann danach erwarten, daß man auf diese Weise in vitro und in vivo auch den biologischen Effekt des Hormons blockieren kann. Die zur Prüfung herangezogenen Antagonisten, Diäthylstilböstrol und Upjohn, vermögen die Bindung des Östradiol zum Uterus zu inhibieren, nicht aber die Bindung des Androsten-17ol zum Uterus (Abb.21,22).

Zum anderen ist die Gewebespezifität eines Steroids charakteristisch für das Vorhandensein einer Rezeptorbindung. Androsten-17ol zeigt in vitro eine dem Östradiol überlegene Bindungskapazität zum Uterus, im Gegensatz zu allen anderen zum Vergleich herangezogenen Gewebearten (Abb.12,14).

Um von einer spezifischen Bindung zu sprechen, müssen Steroidkonzentrationen eingesetzt werden, die den in vivo-Konzentrationen z.B. des Östradiol im Uterus

entsprechen. Bei derart niedrigen Konzentrationen besteht eine hohe Affinität von Östradiol und Androsten-17ol zum Uterus. Bei hohen Steroidkonzentrationen dagegen werden Steroide nicht an spezifische Rezeptoren sondern physikalisch-chemisch (z.B. aufgrund der Lipoidlöslichkeit) "gebunden". Daher muß, falls die Bindung nur an spezifische Rezeptoren erfolgt, eine Sättigung der Rezeptoren zu erreichen sein. Dies trifft für Östradiol eher zu als für Androsten-17ol (Abb.18).

Nach eigenen in vitro-Befunden vermindern große Dosen inaktiven Östradiols die Aufnahme von radioaktivem Östradiol im Uterusgewebe (Abb.21). Dies steht im Widerspruch zu in vivo-Befunden von Martin (Lit.87), der feststellt, daß sich nicht die Aufnahme des radioaktiven Östradiols vermindert, sondern die Retention der Radioaktivität über eine längere Zeitspanne.

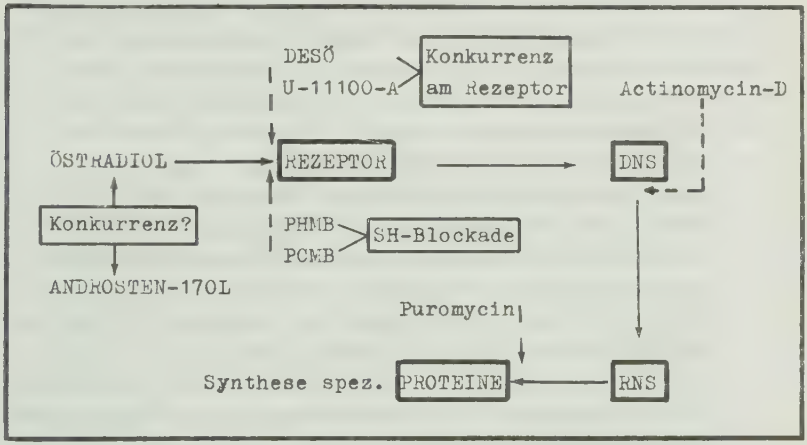
Nach Martin (Lit.57) gibt es zwei Wirkungsweisen von Antagonisten. Zum ersten könnte der Antagonist als Konkurrent wirken, indem er die Rezeptoren besetzt, alternativ könnte er - nicht konkurrierend - die Eigenschaften der Rezeptororte ändern, so daß sie unfähig werden, Östradiol zu binden.

Nach Jungblut (Lit.88) enthalten weibliche und männliche Geschlechtsorgane nebeneinander Rezeptoren für Östradiol und Dihydrotestosteron. Die Bindungsspezifität der beiden Rezeptoren ist unterschiedlich. Ein 10^3-facher Überschuß an Östradiol verhindert die Bindung von Dihydrotestosteron an seinen Rezeptor vollständig, der gleiche Überschuß an Dihydrotestosteron hemmt die Bindung von Östradiol an den Östradiol-Rezeptor nur zu 42%. Hiernach gibt es eine "Überkreuz"-Affinität für das "eigene" Hormon und das des "entgegengesetzten" Geschlechtes. Dies kann als ein Hinweis dafür genommen werden, daß auch Androsten-17ol eine Affinität zum Östradiol-Rezeptor haben kann, wodurch die hohe Bindung zum Uterus zu erklären wäre. Auf der anderen Seite wäre auch die Inhibierung der Östradiol-Bindung durch Androsten-17ol

zum Uterus zu erklären.

Wenn eine Bindung von Dihydrotestosteron zum Östradiol-Rezeptor möglich ist, müßte ein großer Überschuß an Testosteron, obwohl Testosteron weniger wirksam ist als Dihydrotestosteron, auch die Bindung des Östradiol zum Uterus hemmen. Dies steht allerdings im Gegensatz zu der Feststellung von Terenius (Lit.66). Eigene Befunde hatten eine Verminderung des Einbaus von Östradiol in den Uterus durch Testosteron gezeigt (Abb.21). Man findet also eine gewisse Parallelität zu den Befunden von Jungblut.

In folgendem Schema sind die Reaktionsorte der antiöstrogenen Substanzen aufgezeigt, die in dieser Arbeit benutzt wurden (Abb.21,22).



Wenn Östradiol und Androsten-17ol um dieselben Rezeptoren am Zielorgan konkurrieren sollen, so müßte eine gegenseitige Hemmung der Steroide bei der Aufnahme am Rezeptor oder sogar bei der Bildung der Rezeptoren wirken. Das Ergebnis müßte jedoch das gleiche sein, eine Aufnahme des einen Steroids (z.B. Östradiol oder Androsten-17ol) würde durch Zugabe eines Überschusses des anderen Steroids (z.B. Androsten-17ol oder Östradiol)

verhindert. Androsten-17ol wirkt inhibierend auf die Östradiol-Aufnahme des Uterus, Östradiol wirkt jedoch nicht inhibierend auf die Androsten-17ol-Aufnahme. Androsten-17ol verdrängt also kompetitiv Östradiol am Rezeptor. Dies geschieht aber offenbar dadurch, daß die Lipoide durch Androsten-17ol überschwemmt werden. Dies ist dann eine unspezifische Fähigkeit,die aufgrund der großen Lipoidlöslichkeit zustandekommt.

Diäthylstilböstrol und U-11100 A verhindern die Steroidaufnahme durch kompetitive Verdrängung am Rezeptor. Dies trifft für die Östradiol-Aufnahme zu, für Androsten-17ol nicht. p-Chlormercuribenzoat als sogenanntes SH-Reagens entfaltet seine Wirkung durch die Reaktivität gegenüber SH-Gruppen. Es ist möglich, daß es die Konformation des Rezeptor-Proteins ändert, in Analogie zum bekannten Effekt der organischen Mercuralien auf die Konformation der Glutamat-Dehydrogenase (Lit.89). Die Östradiol-Aufnahme wird hierdurch gehemmt, die Androsten-17ol-Aufnahme nicht.

Actinomycin D blockiert die Weitergabe der in der DNS gespeicherten genetischen Information durch Hemmung der RNS-Polymerasen. Puromycin greift in die Synthese der Peptidketten an den Polysomen des endoplasmatischen Retikulums ein; das Antibiotikum wird an Stelle eines weiteren Moleküls Amino-acyl-Transfer-RNS an die Peptidkette gebunden. Dadurch wird der Polymerisationsprozess sofort unterbrochen und das "unfertige" biologisch inaktive Polypeptid von den Polysomen abgelöst (Lit.90). Da die beiden Antibiotika die Proteinsynthese an verschiedenen Stellen hemmen, kann man aus der Actinomycin D- oder der Puromycin-Sensibilität einer hormonbedingten Uterusbindung, auf das Vorhandensein einer Rezeptor-Protein-Bindung schließen.

Bei Östradiol scheint das der Fall zu sein, die Bindung wird gehemmt, entgegen den in vivo-Befunden von Jensen (Lit.74). Da die Androsten-17ol-Bindung bedeutend

weniger gehemmt wird, kann man den Schluß ziehen, daß es sich bei der Androsten-17ol-Bindung nicht um die gleiche Art der Bindung handeln kann wie bei Östradiol.

Ein weiterer Hinweis für eine bestehende Östradiol-Protein-Bindung ist der Befund, daß bei Fraktionierung des Gewebes in der Proteinfaktion eindeutig Aktivität aus Östradiol gefunden wird, während Androsten-17ol überhaupt nicht an die Proteinfraktion gebunden wird (Abb.16). Die starke Bindung des Androsten-17ol beruht demnach nur auf einer durch gute Lipoidlöslichkeit bedingten "Bindung" des Hormons. Trotzdem ist immer noch nicht zu erklären, warum aus der Vielfalt der Substrate ausgerechnet Androsten-17ol - und natürlich auch Östradiol - gegen das Konzentrationsgefälle so stark in den Uterus im Vergleich zu anderen Gewebearten aufgenommen wird. Nach den oben angeführten Befunden beruht die Affinität des Androsten-17ol zum Uterus nicht auf der Bindung an einen Rezeptor. Für Östradiol kann man eine Rezeptor-Bindung dagegen für möglich halten.

Ein weiterer Beweis für den Unterschied zwischen der Androsten-17ol- und der Östradiol-Bindung zum Uterus sind die in vivo-Befunde. Als Charakteristikum für die Rezeptor-bedingte Uterusansprechbarkeit des Östradiol sind die in vivo-Befunde von Jensen und Jakobsen zu werten (Lit.68). Hiernach liegt die Besonderheit beim Östradiol darin, daß Östradiol in vivo nicht nur bevorzugt in den Uterus aufgenommen wird, sondern auch im Zielorgan über eine größere Zeitspanne zurückgehalten wird. Diese Fähigkeit ist für Androsten-17ol eindeutig nicht gefunden worden (Abb.13).

Bedeutung der endokrinologischen Befunde

Die Ergebnisse der endokrinologischen Wirkungstests von Androsten-17ol erscheinen sehr erfolgversprechend, wenn auch die Beurteilung darunter leidet, daß das verwendete Androsten-17ol eine Mischung des 5a- und 5ß-

Isomeren darstellt (Vergleiche Diskussion in Methodik 6.1.3.).

Die Inhibierung des Östradiol-induzierten Uteruswachstums durch verschiedene Dosen von U-11100 A,wurde parallel zur Reduktion der Östradiol-Aufnahme in vivo gefunden, was beweist, daß das Östrogen-Bindungs-Phänomen eng verknüpft ist mit der biologischen Wirkung des Hormons (Lit.74). Es ergibt sich also eine deutliche Verbindung der biologischen und biochemischen Befunde. Im Gegensatz dazu blockieren Actinomycin D und Puromycin das Uteruswachstum so gut wie viele der frühen biochemischen Reaktionen des Uterus auf Östrogene, sie stören jedoch nicht die Bindung von Östradiol an das Zielorgan in vivo. Daher ist die Östrogen-Rezeptor-Wechselwirkung ein früher Schritt im Aufnahmeprozess, der alle biosynthetischen Reaktionen im Uterus einleitet, die mit Actinomycin D oder Puromycin hemmbar sind.

Nach Lit.56 verursacht Östradiol im Uterus der kastrierten Ratte einen signifikanten Anstieg des Uterusgewichts, sowie des RNS- und Proteingehalts pro Zelle. Eine histologisch faßbare Zellvermehrung ist nicht zu beobachten. Diese Befunde stimmen mit den Reaktionen während des normalen zyklischen Ablaufs im Östrus überein.

Tab. 6 Antiöstrogene Wirkung von Androsten-17ol und Testosteron bei Östron-induziertem Uteruswachstum

Versuchsbedingungen wie in Abb.24 und 6.2.6. beschrieben. Berechnung der prozentualen Hemmung des Uteruswachstums siehe 6.2.6.

Behandelt mit:	mg Uterus/10g Maus		prozentuale Hemmung	
	feucht	trocken	feucht	trocken
unbehandelte Kontr.	9,0 ± 1,5	1,4 ± 0,3	-	-
0,1µg Östron	30,5 ± 5,4	5,2 ± 0,7	0	0
0,1µg Östron + 1,0mg Testosteron	22,5 ± 3,3	4,4 ± 0,5	37%	21%
0,1µg Östron + 1,0mg Androsten-17ol	15,5 ± 4,8	-	70%	-

Nach den eigenen Beobachtungen an infantilen Tieren resultierte aus der exogenen Östrogenzufuhr ein Anstieg der Uterusgewichte durch Wassereinlagerung, aber auch eine Gewichtsvermehrung der Trockengewichte der Uteri. Androsten-17ol verminderte die Östron-induzierte Gewichtszunahme durch Wassereinlagerung (Vergleiche Tab.6).

Geht man davon aus, daß auch Östron eine erhebliche östrogene Wirkung besitzt, wie in 3.3.2.anhand des Östron-induzierten Uteruswachstums gezeigt wird, so muß diese Wirkung dadurch entstanden sein, daß es im intermediären Stoffwechsel zu Östradiol reduziert worden ist und in dieser Form zum Zielorgan gelangt. Da Androsten-17ol aber andererseits Östron zu Östradiol reduzieren kann, sollte man mit Androsten-17ol die Östrogenität von Östron erhöhen können. Dies steht im Widerspruch zu dem endokrinologischen Befund, daß Androsten-17ol die Wirkung des Östron inhibiert, in diesem Falle also das Östron-induzierte Uteruswachstum hemmt.

Die Erklärung hierfür könnte sein, daß Androsten-17ol im Überschuß vorhanden ist, und deswegen in der Lage ist Östradiol kompetitiv zu verdrängen, und dadurch die Östradiol-Wirkung auf den Uterus ausbleibt. Verringert man nämlich die Androsten-17ol-Konzentration, so bleibt eine antiöstrogene Wirkung aus.

Vergleicht man die antiöstrogene Wirkung des Androsten-17ol (3.3.2.) mit Substanzen, die von der Schering AG, Berlin, unter identischen Bedingungen und bei gleichen Konzentrationen getestet wurden, so zeigt sich, daß Androsten-17ol besser oder ebenso gut antiöstrogen wirkt wie die in Abb.28 dargestellten Substanzen. Deutlich überlegen ist nur Stanazolol "Stromba".

In Abb. 29 wird die androgene Wirkung derselben Substanzen, ebenfalls unter identischen Bedingungen durch die Schering AG getestet, dargestellt. Hier liegt Androsten-17ol eindeutig in der Nähe der Werte für die Kontrolle der unbehandelten Tiere. Auch die anabole Wirkung liegt in einem Bereich (Abb.30), der der anabolen

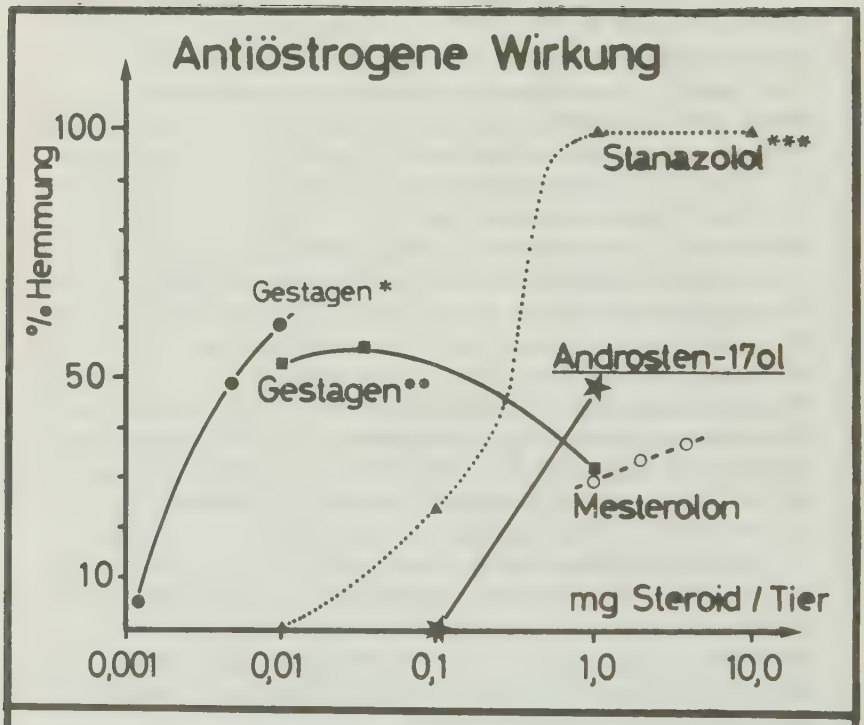


Abb. 28 Hemmung des Östron-induzierten Uteruswachstums durch verschiedene Steroide

Einzelheiten der Bedingungen s. Meth. u. Abb.24. Die Werte der Referenzsubstanzen stammen von der Schering AG. (In jeder Beziehung unter identischen Bedingungen auch mit den eigenen Versuchen getestet.)
Ordinate: % Hemmung des durch 0,1µg Östron-induzierten Uteruswachstums
Abszisse: mg Steroid 3 x s.c. appliziert / Maus

+ 17ß-Hydroxy-18-methyl,17a-aethinyl-4-oestren-3-on (17a-aethinyl-19-nortestosteron)

++ 6-Chlor-17a-acetoxy-1a,2a-methylen-4,6-pregnadien-3,20-dion

+++ 2.3(Δ 2',4'-pyrazolon-4',3')17ß-hydroxy-17a-methyl-androstan

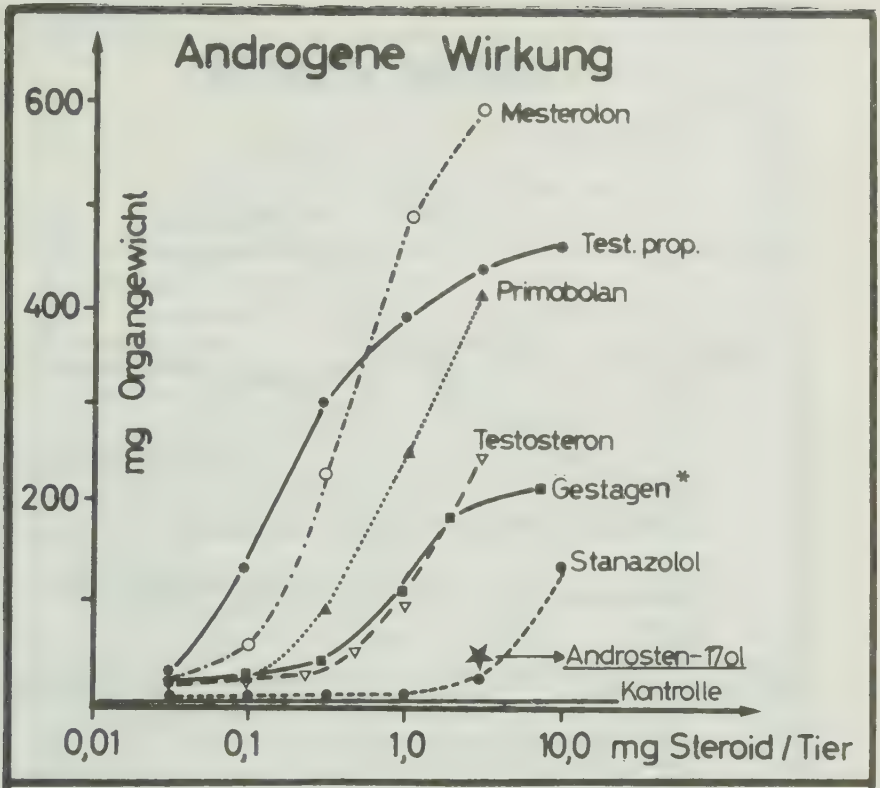


Abb. 29 Vergleich der androgenen Wirkung verschiedener Steroide (Wachstum der Samenblase)

Einzelheiten der Bedingungen s. Meth. u. Abb.27,28.
Werte der Ref.-Subst. Schering AG
Ordinate: mg Feuchtgewicht der Samenblase/100g Ratte
Abszisse: mg Steroid 12 x s.c. appliziert/Ratte
+siehe Abb.28

Wirkung der meisten anderen Steroide unterlegen ist.

Wenn man die Werte aus Abb.28-30 klassifiziert, so ergibt sich bei einem Vergleich aller herangezogenen Substanzen nach Tab.7 folgendes Bild: Androsten-17ol zeichnet

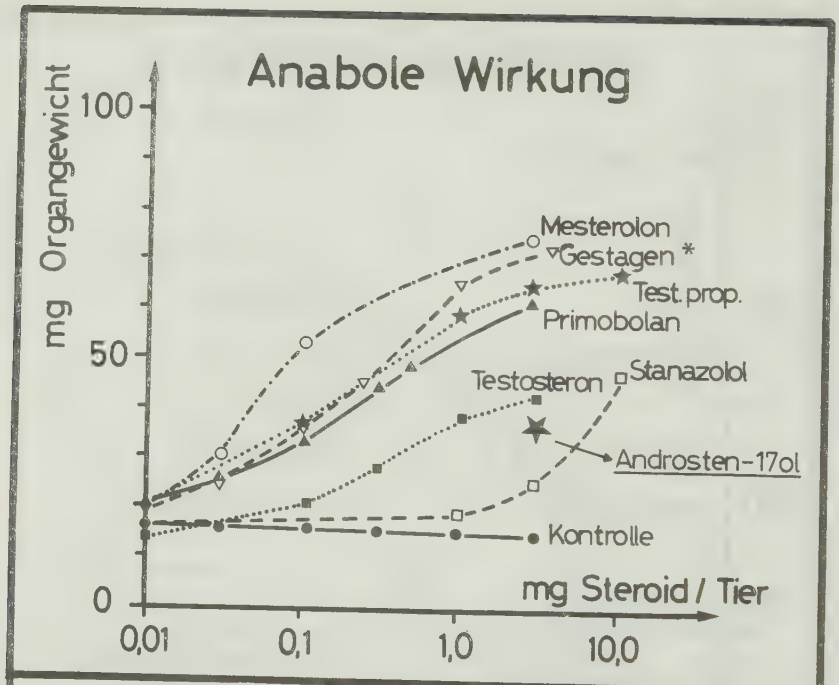


Abb.30 Vergleich der anabolen Wirkung verschiedener Steroide (Wachstum des M. levator ani)

Einzelheiten der Bedingungen s. Meth. u. Abb.27,28.
Werte der Ref.-Subst. Schering AG
Ordinate: mg Feuchtgewicht des M.levator ani/100g Ratte
Abszisse: mg Steroid 12 x s.c. appliziert/Ratte
+siehe Abb.28

sich neben Stanazolol durch eine deutliche antiöstrogene Wirkung aus. Ein Fehlen der androgenen und östrogenen Wirkung und nur eine relativ mäßige anabole Wirkung lassen die Substanz interessant erscheinen, denn z.B. Testosteron hatte nach eigenen Befunden nur eine prozentuale Hemmung der Uterusgewichtszunahme von 37% im Vergleich zu 70% Hemmung durch Androsten-17ol (Vergleiche Tab.6). Testosteron

wirkt im Gegensatz zu Androsten-17ol stark androgen.

Tab. 7 Vergleich der endokrinologischen Wirkungen verschiedener Steroide

+ 17ß-Hydroxy-18-methyl,17a-aethinyl-4-oestren-3-on

++ 6-Chlor-17a-acetoxy-1a,2a-Methylen-4,6-Pregnadien-3,20-dion

behandelt mit :	WIRKUNG		
	antiöstrogen	androgen	anabol
Androsten-17ol	+	-	+
Androsten-17on	-	-	+
17ß-Acetoxy-androsten		+	+
Stanazolol	+	-	+
Primobolan		+	+
Mesterolon	+	+	+
Testosteron	-	+	+
Test.prop.		+	+
Gestagen+	+	+	+
Gestagen++	+		

Ausblick

Will man den möglichen Nutzen bei der Therapie hormonabhängiger maligner Tumore in Betracht ziehen, so ergibt sich folgendes Bild.

Nach Folca (Lit.91), Braunsberger (Lit.92) und Jensen (Lit.93) sollen sich z.B. die menschlichen Mammakarzinome

hinsichtlich der Östradiol-Aufnahme analog den experimentell induzierten Karzinomen der Ratte verhalten.

Experimentell erzeugte Mammatumoren wurden bereits intensiv untersucht, ebenso die durch Füttern oder Injektion von karzinogenen Dimethylbenzanthrazenen erzeugten Mammatumore (Lit.94,95). Diese hormonabhängigen Tumoren ähneln dem Uterus und der Vagina und deren Affinität zum Östradiol (aber nicht zu Östron), und der Empfindlichkeit der Aufnahme gegen Bindungs-Inhibitoren (Lit.96-99, 52,53 54). Ein Vergleich dieser hormonabhängigen Tumoren mit der Reaktivität des Östradiol und Androsten-17ol zum Uterus erscheint also zulässig.

Bei einer Hormontherapie von Mammatumoren sprechen ca. 20% aller in Frage kommenden Patientinnen auf eine genügend hoch dosierte Therapie mit männlichem Sexualhormon (meist in Form von Testosteron verabreicht) an (Lit.100). Androgene wären also "geeignete" Hormone zur Behandlung derartiger Fälle. Diese Androgentherapie ist jedoch in der für diesen Zweck notwendigen hohen Dosierung mit unerwünschten Nebenwirkungen belastet. Gewünscht ist zwar die antiöstrogene Wirkung des Androgens auf den Tumor, nicht jedoch die androgene Wirkung auf den Organismus (Folgen sind z.B. Virilisierungserscheinungen bei den Patientinnen).

Androsten-17ol würde hier gewisse Vorteile bieten, da es deutlich antiöstrogen wirkt, andererseits aber wesentlich geringere androgene Eigenschaften besitzt, im Gegensatz zu den zum Vergleich herangezogenen Substanzen.

Vergleichende Untersuchungen haben gezeigt, daß Östrogene in niedriger Dosierung das Wachstum von Mammakarzinomen stimulieren, in hoher Dosierung jedoch hindern (Lit.101), und daß der gewünschte Effekt länger anhält als unter Androgenen. Es zeigt sich jedoch, daß auch diese Therapie eine Reihe unerwünschter Nebenwirkungen hat.

Androsten-17ol erwiese sich auch hier als vorteilhaft, da es keinerlei östrogene Eigenschaften besitzt.

Behandelt man mit Corticosteroiden so zeigen sich

schwerwiegende Nebenerscheinungen. Eine Therapie mit Gestagenen zeigt zwar keine unerwünschten Nebenwirkungen, erweist sich aber der Androgen-Östrogen-Therapie unterlegen (Lit.102,103).

Da Androsten-17ol eine gewisse anabole Wirkung zeigt, wäre ein Vergleich mit anderen Anabolika interessant. Alle bekannten sogenannten anabolen Steroide sind auf ihre Wirkung beim metastasierenden Mammakarzinom untersucht worden. Das Ziel dieser Versuche ist die Entdeckung einer Substanz, die gleich gut auf das Tumorwachstum wirkt wie ein Androgen oder ein Östrogen, ohne deren unerwünschte Nebenerscheinungen zu besitzen. So gelang es bis heute nicht, die virilisierende Wirkung dieser substituierten Androgene auf die Patientinnen von dem günstigen Einfluß auf das Tumorwachstum zu dissoziieren (Lit.104). Die therapeutische Wirkung der Anabolika entspricht nämlich der der Androgene in dem Maße, als sie auch virilisierende Eigenschaften besitzen.

Eine Testung von Androsten-17ol unter diesen Gesichtspunkten erscheint also sinnvoll. Leider war kein Hersteller von Adrenokarzinomen der Mamma, nach der Methode von Huggins (Lit.94,95) gezüchtet, zu finden. Außerdem ist die Erzeugung solcher Tumore durch i.v.-Injektionen bestimmter Kohlenwasserstoffe ein recht schwieriges Unterfangen.

5. ABBILDUNGEN

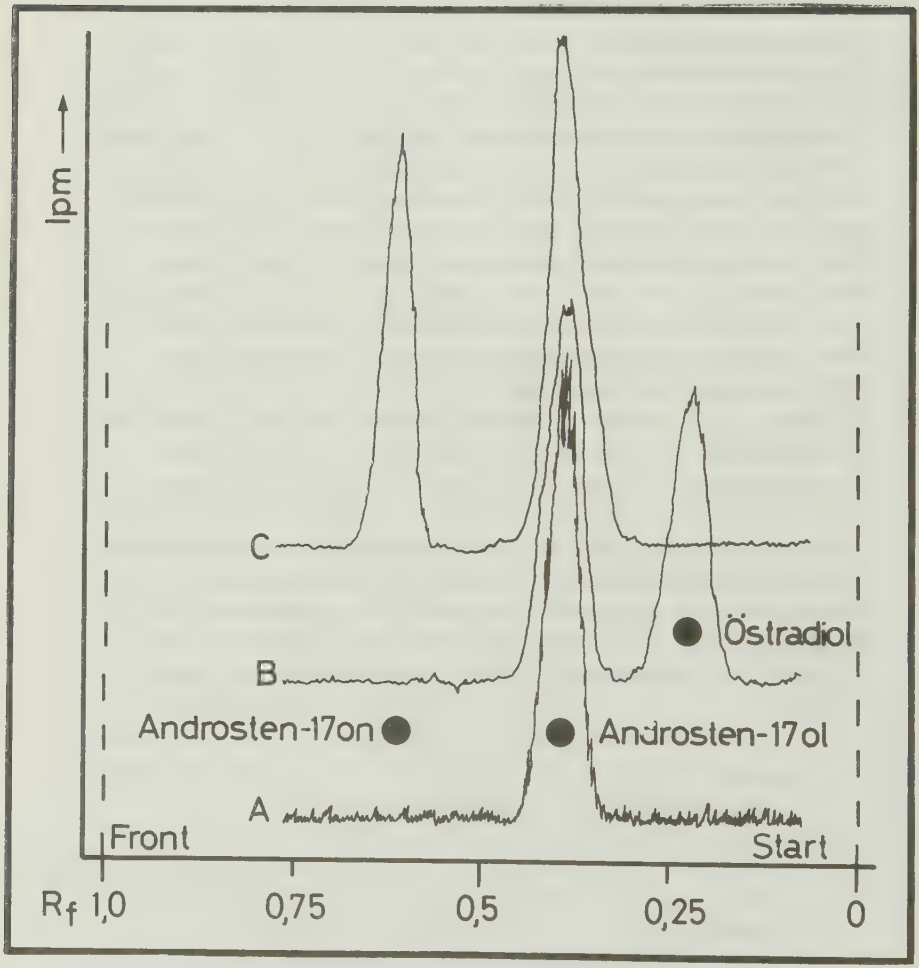


Abb. 1 Radio-Dünnschichtchromatogramm der Metabolite von Androsten-17ol und Östron nach Inkubation mit weiblichem Rattenleberhomogenat

A: Kontrolle mit 17aT-Androsten-17ol (0,1µMol/l)
B: Ansatz mit 17aT-Androsten-17ol (0,1µMol/l und Östron (10 µMol/l)
C: Ansatz mit 7aT-Androsten-17ol (0,1µMol/l)
Inkubationsbedingungen und Chromatographie siehe Methodik. Laufmittel: Chloroform/Aceton 90/10

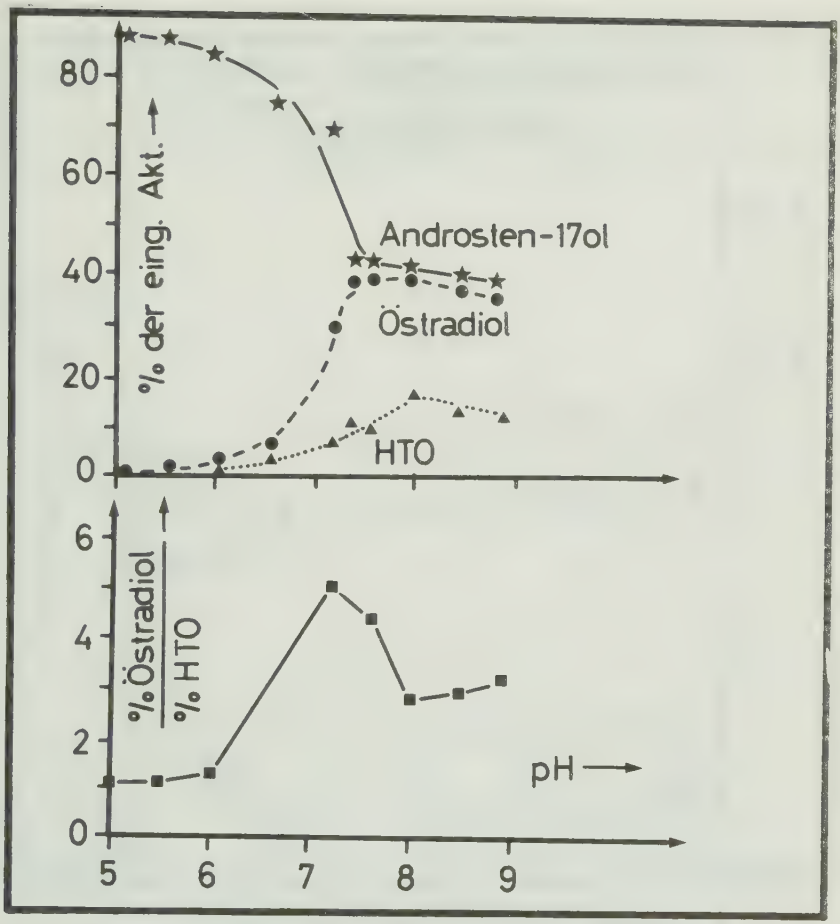


Abb. 2a pH-Abhängigkeit des Tritium-Einbaus aus 17aT-Androsten-17ol in HTO und Östradiol-17aT

Die Ansätze enthielten 0,1µMol/l Donator und 10µMol/l Akzeptor mit 100mg weibl. Rattenleberhom. in einem Endvolumen von 3,2ml. Inkubationsbedingungen und Bereitung der Puffer siehe Meth. Ordinate: % der eingesetzten Aktivität. (n = 2)

2b Effektivität des Tritium-Transfers bezogen auf die HTO-Bildung

Werte aus Abb.2a übertragen
Ordinate: $\frac{\%\ 17aT\text{-Östradiol}}{\%\ HTO}$ (n = 2)

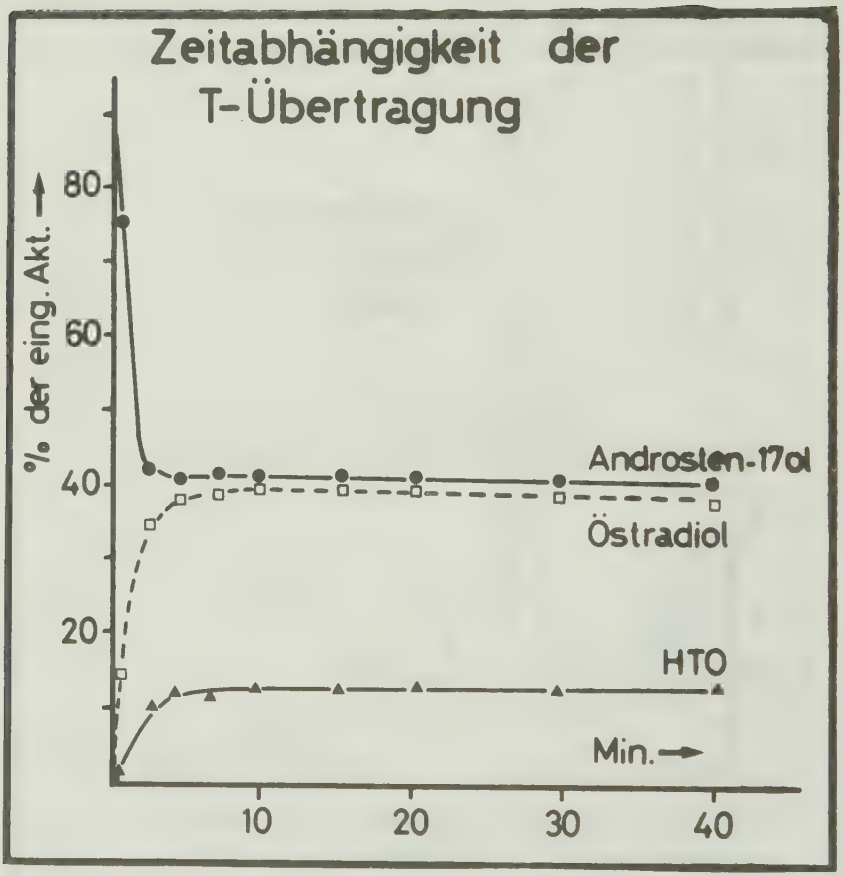


Abb. 3 Zeitabhängigkeit des Tritium-Einbaus aus 17aT-Androsten-17ol in HTO und 17aT-Östradiol

Die Ansätze enthielten 0,1µMol/l 17aT-Androsten-17ol und 10µMol/l Östron in einem Endvolumen von 3,2ml. 100mg weibliches Rattenleberhomogenat wurden jeweils mit 3,0ml Tris-HCL-Puffer bei 37°C inkubiert.
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität (n = 2)

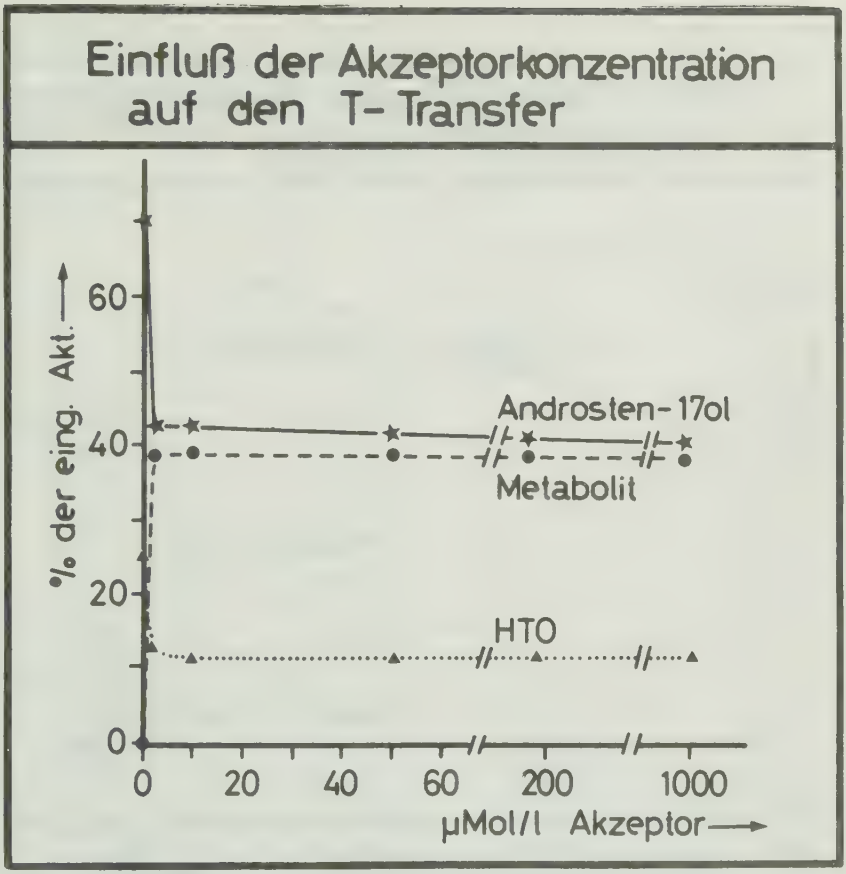


Abb. 4 Abhängigkeit des Tritium-Einbaus aus 17aT-Androsten-17ol in HTO und 17aT-Östradiol von der Östron-Konzentration

Ansätze: 100mg einer weiblichen Rattenleber wurden mit 3,0ml Tris-HCL-Puffer pH 7,4 homogenisiert und mit 0,1µMol/l 17aT-Androsten-17ol und wechselnden Konzentrationen von Östron 15 Minuten bei 37°C inkubiert.
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität (n = 2)

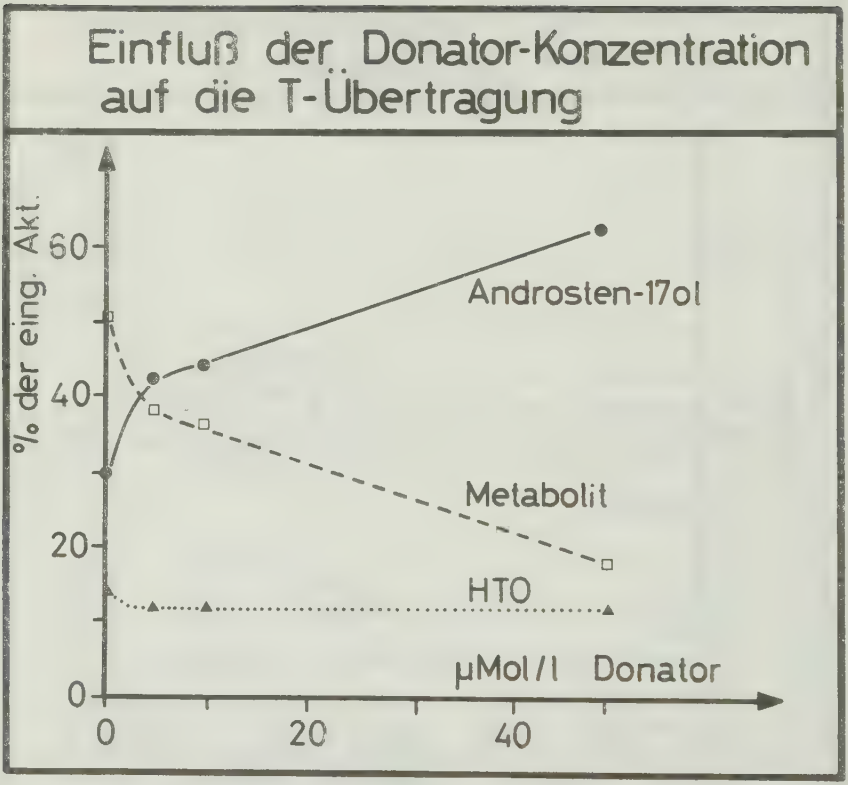


Abb. 5 Abhängigkeit des Tritium-Einbaus in HTO und 17aT-Östradiol von der Konzentration des 17aT-Androsten-17ol

Ansätze: 100mg Leber einer weiblichen Ratte wurden in 3,0ml Tris-HCL-Puffer pH 7,4 homogenisiert und mit 10µMol/l Östron und wechselnden Konzentrationen von 17aT-Androsten-17ol 15 Minuten bei 37°C inkubiert.
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität (n = 2)

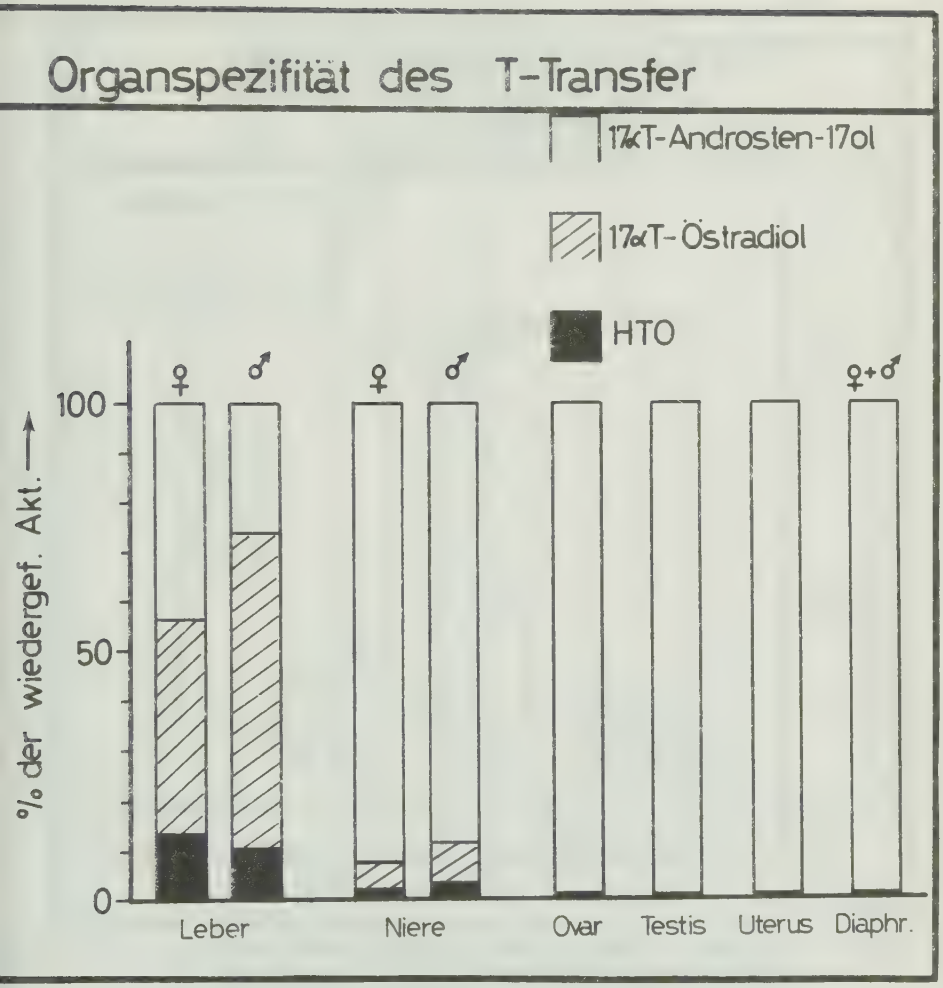


Abb. 6 Organspezifität des Tritium-Einbaus aus 17aT-Androsten-17ol in HTO und 17aT-Östradiol

Ansätze: ungefähr 100mg Organschnitte erwachsener Ratten wurden in 3,0ml Ringer-Phosphat-Puffer pH 7,4 15 Minuten bei 37°C inkubiert.
Steroid-Konzentrationen: 17aT-Androsten-17ol: 0,1µMol/l
Östron: 10µMol/l
Ordinate: % der wiedergefundenen Aktivität, die im Mittel 80-90% der eingesetzten Aktivität betrug.(n = 2)
% Angaben bezogen auf jeweils die gleiche Gewebemenge

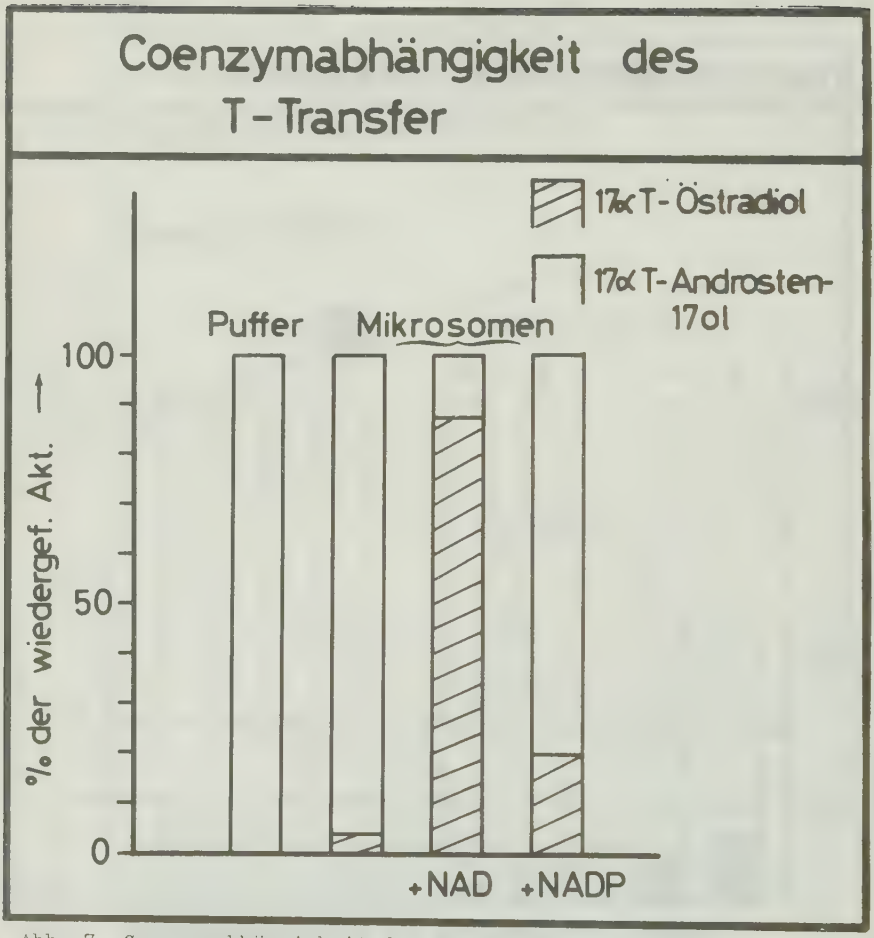


Abb. 7 Coenzymabhängigkeit des Tritium-Transfers von 17aT-Androsten-17ol auf Östron in Mikrosomen

Ansätze: Bereitung der Mikrosomen s. Meth. Es wurde mit einer Menge gearbeitet, die 100mg weibl. Lebergewebe entsprach. Es wurde in einem Gesamtvolumen von 3,2ml Tris-Ringer-Lösung pH 7,4 15 Minuten bei 37°C inkubiert.
Coenzym-Konzentrationen: 100µMol/l NAD bzw. NADP
Steroid-Konzentrationen: 17aT-Androsten-17ol: 0,2µMol/l
Östron: 10µMol/l
Ordinate: % der wiedergefundenen Aktivität (n = 3)
Der Ansatz mit reiner Pufferlösg. diente als Kontrolle

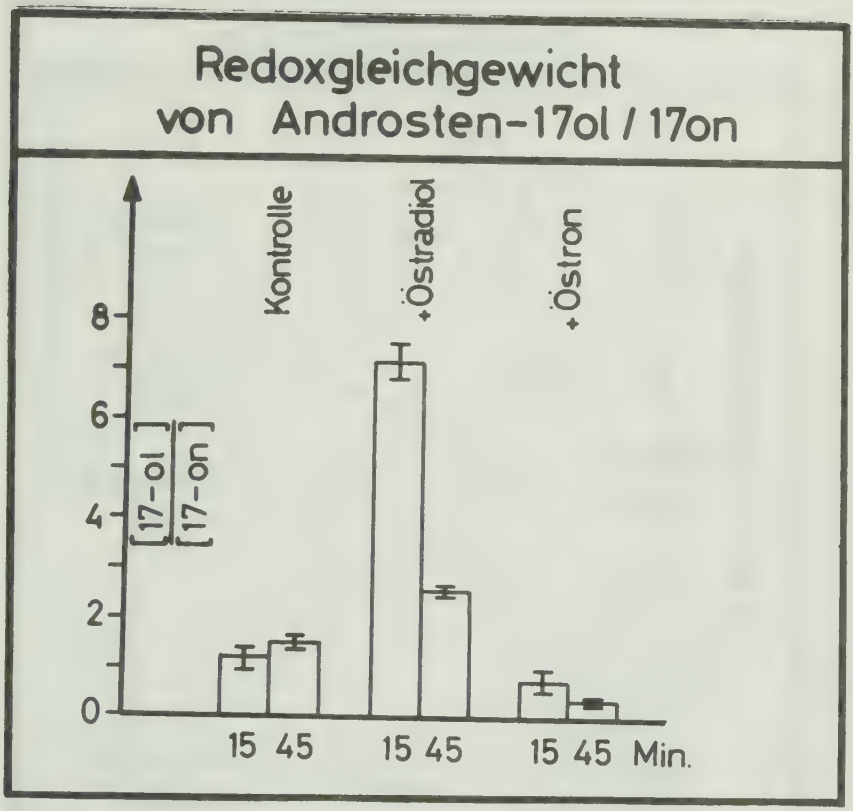


Abb. 8 Einfluß von Östradiol und Östron auf die Oxidation von 7aT-Androsten-17ol zu 7aT-Androsten-17on in vitro

Ansätze: 100mg Leberschnitte weiblicher Ratten wurden in 3,0ml Ringer-Phosphat-Puffer pH 7,4 bei 37°C inkubiert.
Steroid-Konzentrationen: 7aT-Androsten-17ol: 0,1 µMol/l
Östron: 10µMol/l, Östradiol: 10µMol/l
Ordinate: $\frac{\text{Gehalt an Androsten-17ol}}{\text{Gehalt an Androsten-17on}}$ (n = 2)

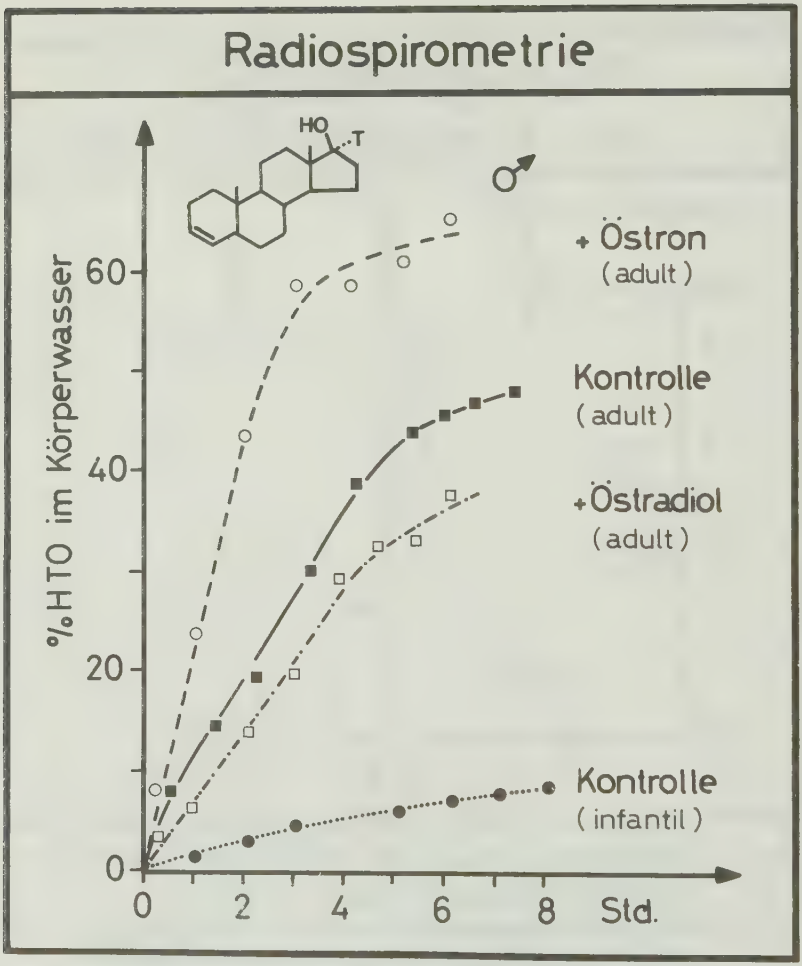


Abb. 9 Oxidation von 17aT-Androsten-17ol in männl. Ratten bei Östron- und Östradiol-Zugabe (Radiospirometrie)

Injektion der in Äthanol gelösten Steroide: 17aT-Androsten-17ol: 5,5µCi (7,4µg/kg), Östron: 30mg/kg, Östradiol: 30mg/kg; pro Tier 0,1ml bzw. 0,2ml i.m.
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO im Körperwasser vorliegend, entsprechend der Oxidation am C-17-Atom. (n = 2)

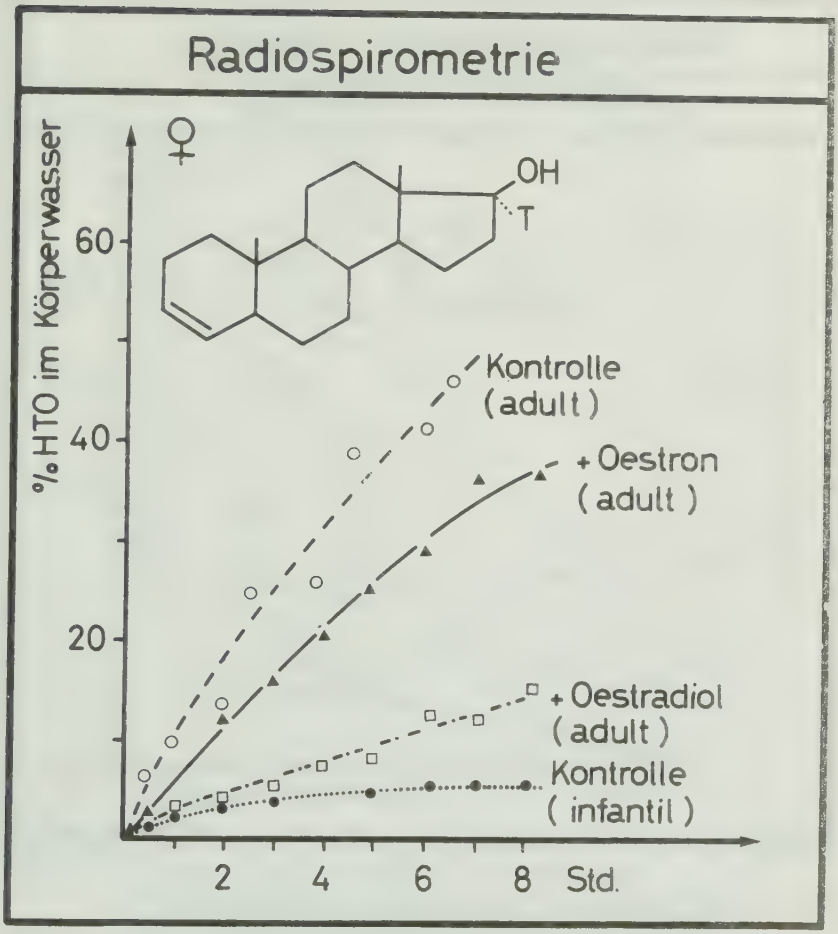


Abb. 10 Oxidation von 17aT-Androsten-17ol in weibl. Ratten bei Östron- und Östradiol-Zugabe (Radiospirometrie)

Injektion der in Äthanol gelösten Steroide: 17aT-Androsten-17ol: 5,5µCi (7,4µg/kg), Östron: 30mg/kg, Östradiol: 30mg/kg; pro Tier 0,1ml bzw. 0,2ml i.m.
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO im Körperwasser vorliegend, entsprechend der Oxidation am C-17-Atom. (n = 2)

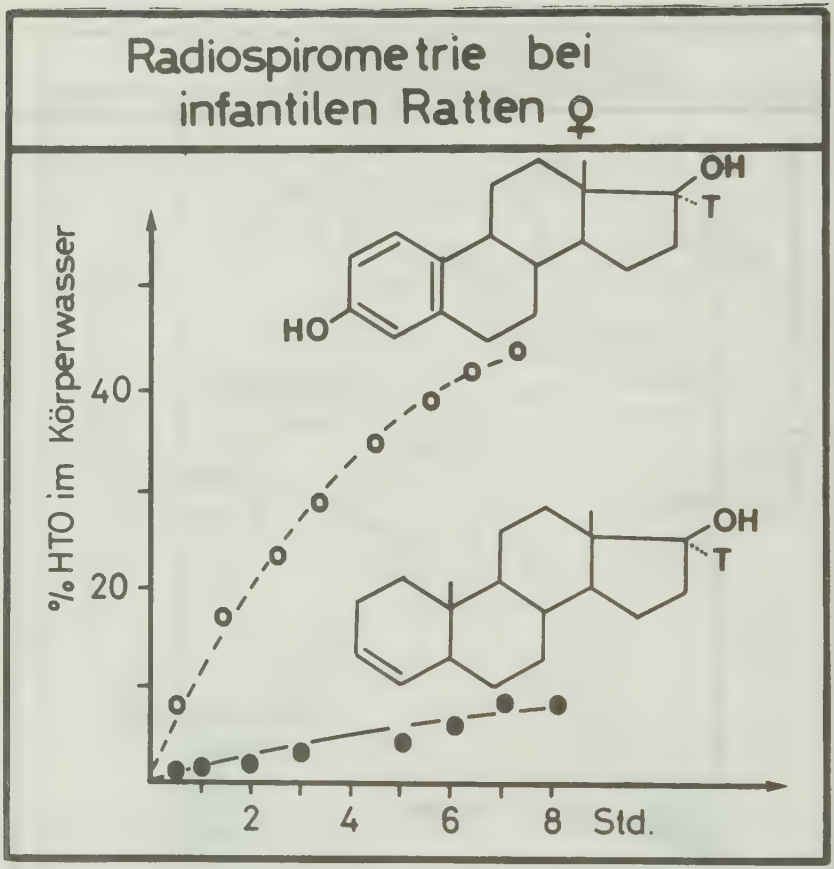


Abb. 11 Oxidation von 17aT-Androsten-17ol in weibl. infantilen Ratten (Radiospirometrie)

Injektion der in Äthanol gelösten Steroide: 17aT-Androsten-17ol: 5,5µCi (7,4µg/kg), 17aT-Östradiol: 11,0µCi (6,4µg/kg); pro Tier 0,1ml i.m.
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO im Körperwasser vorliegend, entsprechend der Oxidation am C-17-Atom. (n = 2)

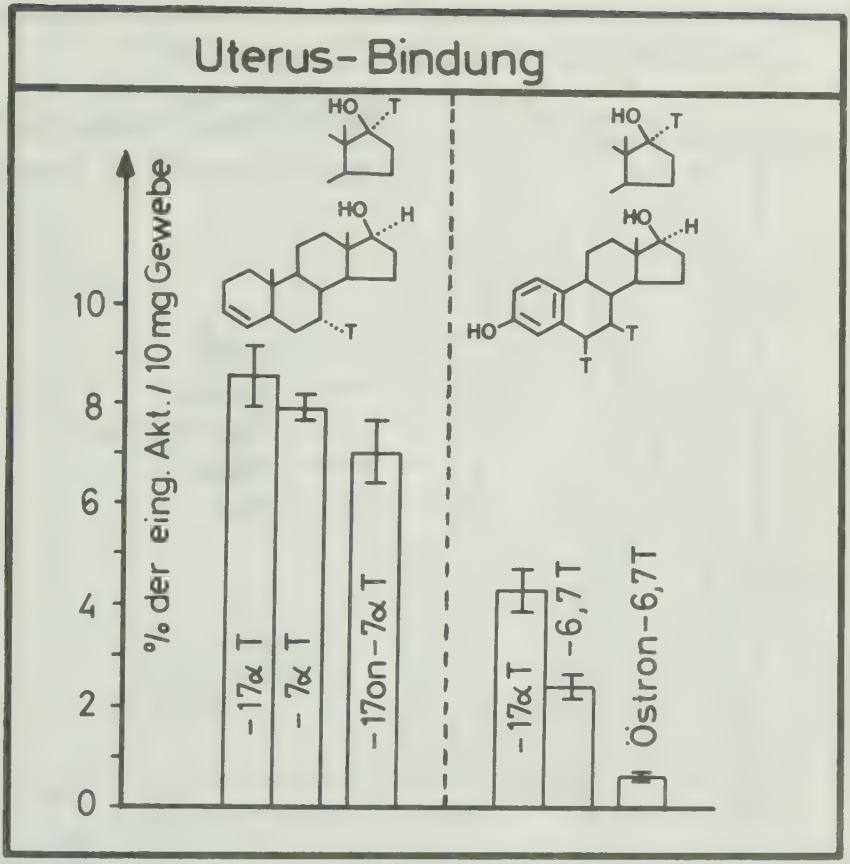


Abb. 12 Vergleich des Tritium-Einbaus in Uterusgewebe infantiler Ratten

Ansätze: Je ein Uterushorn (7-12mg) wurde mit $3{,}2 \times 10^{-9}$Mol/l der Steroide in 3,0ml Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer pH 7,4 mit 1mg Glucose/ml 90 Min. inkubiert und 60 Min. mit 3×10^{-7}Mol/l inaktiver Steroide nachinkubiert. Der abzentrifugierte Uterus wurde gefriergetrocknet, verbrannt und die Radioaktivität gemessen.
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität/10mg Feuchtgewicht des Gewebes, Mittelwert $\pm$ s (n = 5)
Aktivität im Ansatz: 17aT-Östradiol (0,04µCi), 6,7T-Östron/Östradiol (0,12µCi), 17aT-Androsten-17ol (0,021µCi), 7aT-Androsten-17ol/on (0,013µCi)
Weitere Einzelheiten s. Meth.

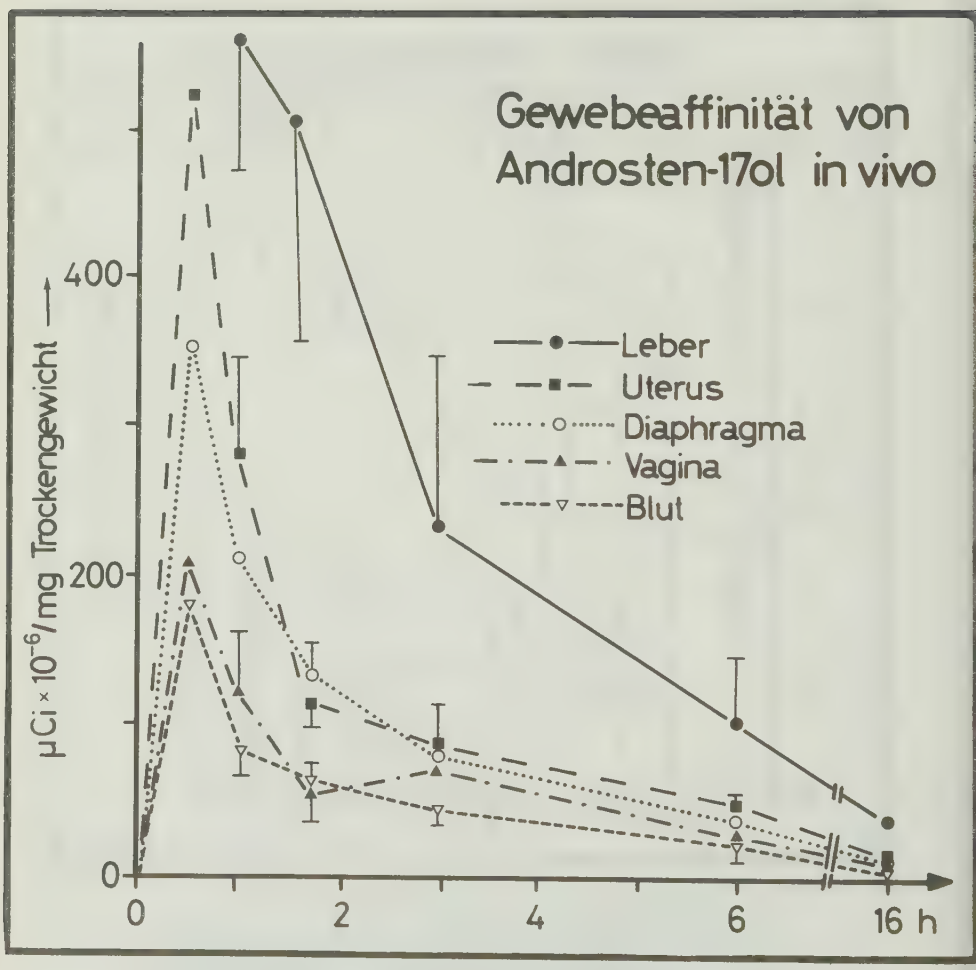


Abb. 13 Tritium-Einbau in verschiedene Organe weibl. infantiler Ratten nach Injektion v. 17aT-Androsten-17ol

Ansätze: Den 20-25 Tage alten weibl. Tieren wurden 4,8µCi 17aT-Androsten-17ol (6mCi/µMol) i.p. injiziert. Nach den angegebenen Zeiten werden die Tiere narkotisiert, getötet und die Organe entnommen. Der Tritium-Einbau wurde in den gefriergetrockneten Gewebeproben bestimmt. Weitere Aufarbeitung s. Meth. Ordinate: Tritium-Einbau pro mg Trockengewicht des Gewebes in µCi x 10^{-6}, die Punkte sind Mittelwerte $\pm$ s (n = 5)

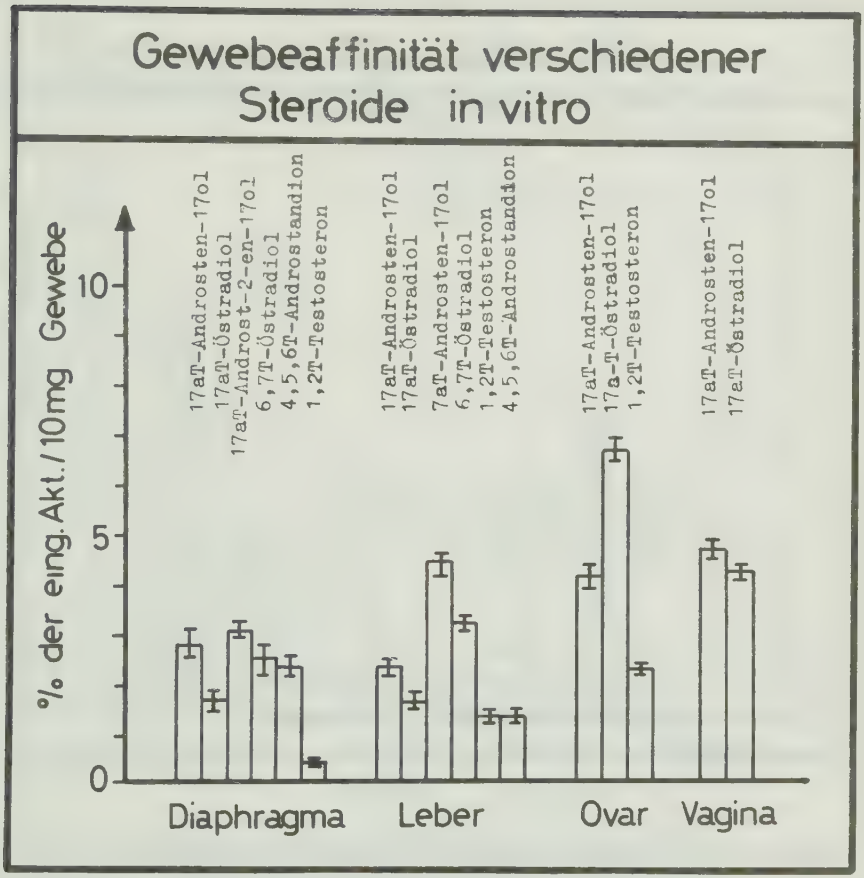


Abb. 14 Tritium-Einbau aus verschiedenen T-markierten Steroiden in Gewebe infantiler weibl. Ratten

Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung der Ansätze siehe Methodik.
Steroid-Konzentrationen: 17aT-Androst-2en-17ol: 3,1 x 10^{-9}Mol/l, 1,2-T-Testosteron: 3,5 x 10^{-9} Mol/l, 4,5,6-T-Androstan-3,17-dion: 2,8 x 10^{-9} Mol/l, sonst wie in Abb.12 beschrieben.
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität/10mg Feuchtgewicht des Gewebes, Mittelwert $\pm$ s (n = 4)

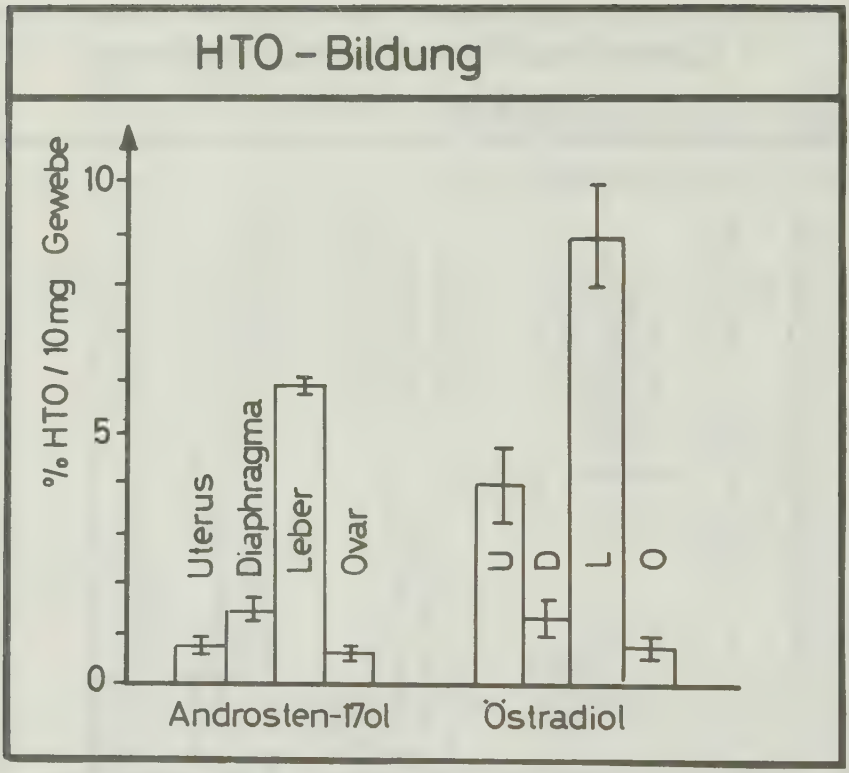


Abb. 15 HTO-Bildung aus 17aT-Androsten-17ol und 17aT-Östradiol bei Inkubationen verschiedener Gewebe infantiler weiblicher Ratten

Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung der Ansätze siehe Abb.12 und Methodik.
Steroid-Konzentrationen: $3{,}2 \times 10^{-9}$ Mol/l
Ordinate: % HTO / 10mg Feuchtgewicht des Gewebes, Mittelwert $\pm$ s (n = 4)

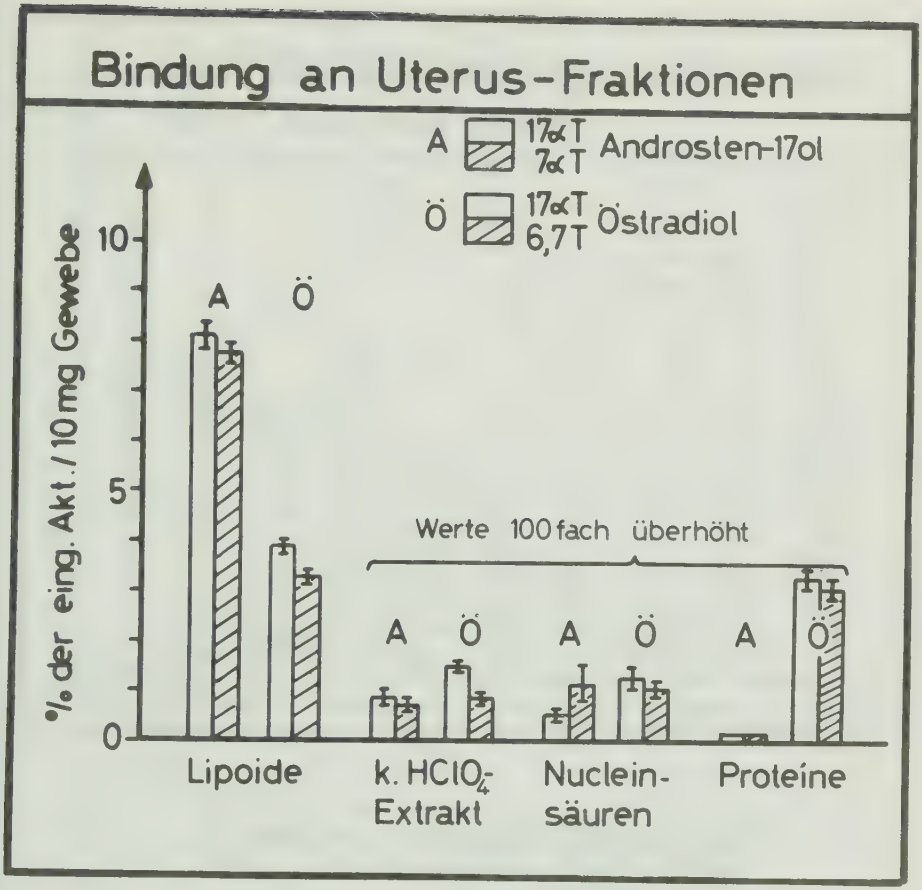


Abb. 16 Tritium-Einbau aus 17aT/7aT-Androsten-17ol und 17aT/6,7T-Östradiol in die Uterus-Fraktionen infantiler Ratten

Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung der Ansätze siehe Methodik.
Steroid-Konzentrationen: siehe Abb.12
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität / 10mg Feuchtgewicht des Gewebes, Mittelwert $\pm$ s ($n = 3$)

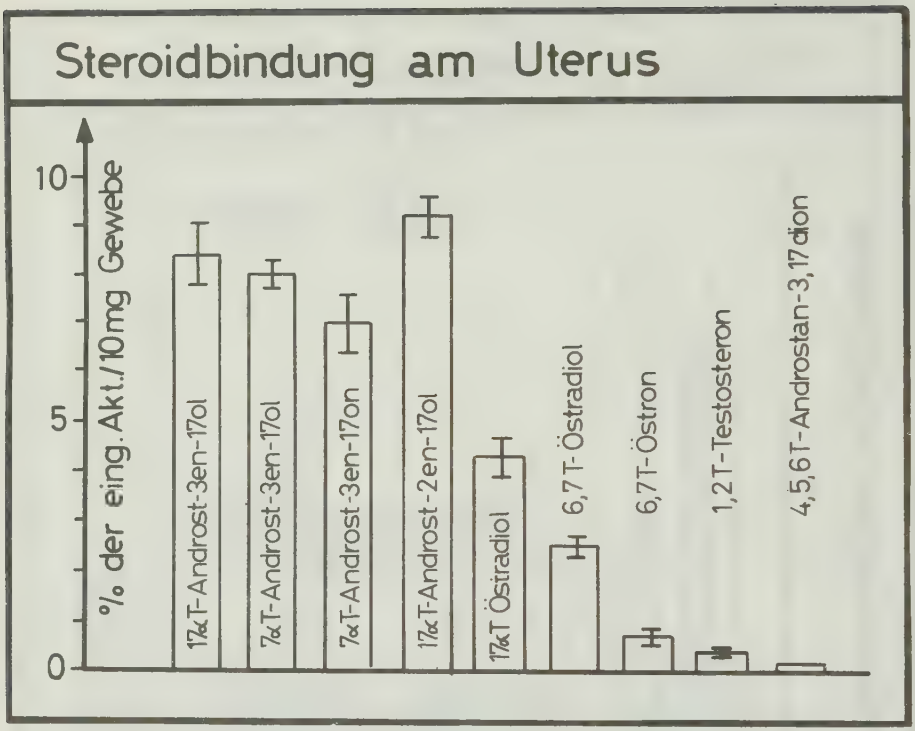


Abb. 17 Substratspezifität des Tritium-Einbaus in uterines Gewebe infantiler Ratten

Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung der Ansätze siehe Methodik.
Steroid-Konzentrationen: 3,1 - 3,5 x 10^{-9} Mol/l
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität / 10mg Feuchtgewicht des Gewebes, Mittelwert $\pm$ s (n = 4)

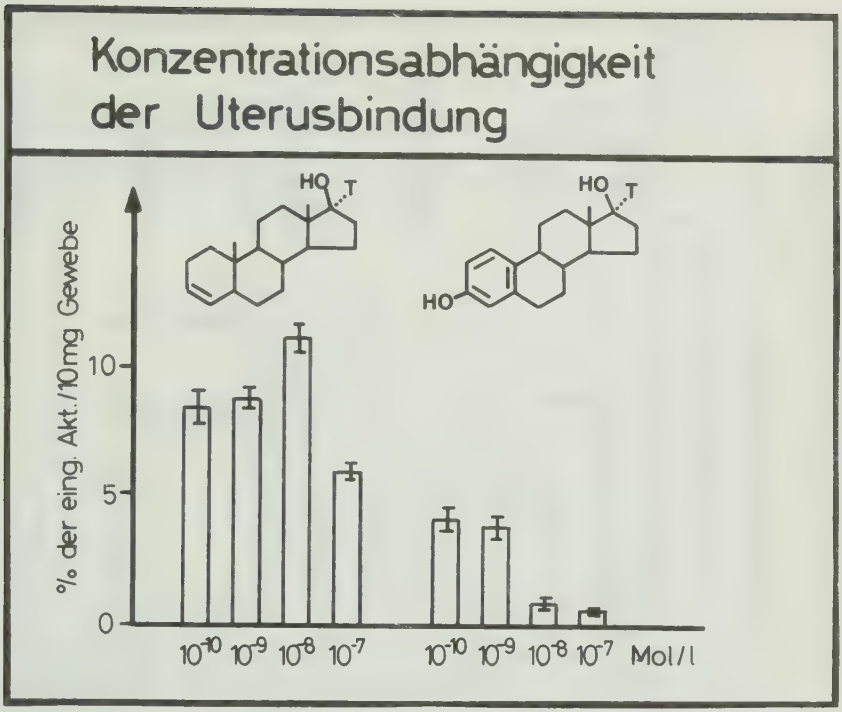


Abb. 18 Konzentrationsabhängigkeit des Tritium-Einbaus in Uterusgewebe infantiler Ratten aus 17aT-Östradiol und 17aT-Androsten-17ol

Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung der Ansätze siehe Methodik.
Steroid-Konzentrationen: $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-7}$ Mol/l
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität / 10mg Feuchtgewicht des Gewebes, Mittelwert $\pm$ s (n = 5)

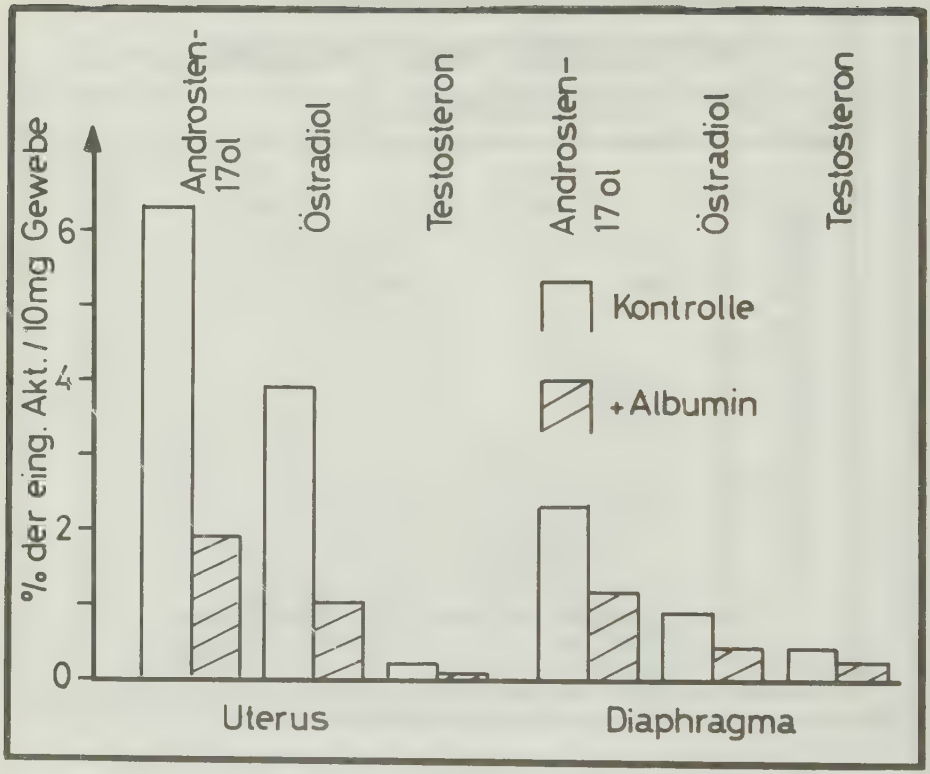


Abb. 20 Tritium-Einbau in Uterusgewebe infantiler Ratten bei Zugabe von Albumin

Ansätze: Je ein Uterushorn wurde mit 3,0-3,4 x 10^{-9} Mol/l der Steroide in 3,0ml Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer pH 7,4 mit 1mg Glucose / ml mit und ohne Albuminzusatz (2%, Gewicht/Volumen) 90 Minuten inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in Abb.12 und Methodik beschrieben.
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität / 10mg Feuchtgewicht, Mittelwert $\pm$ s (n = 5)

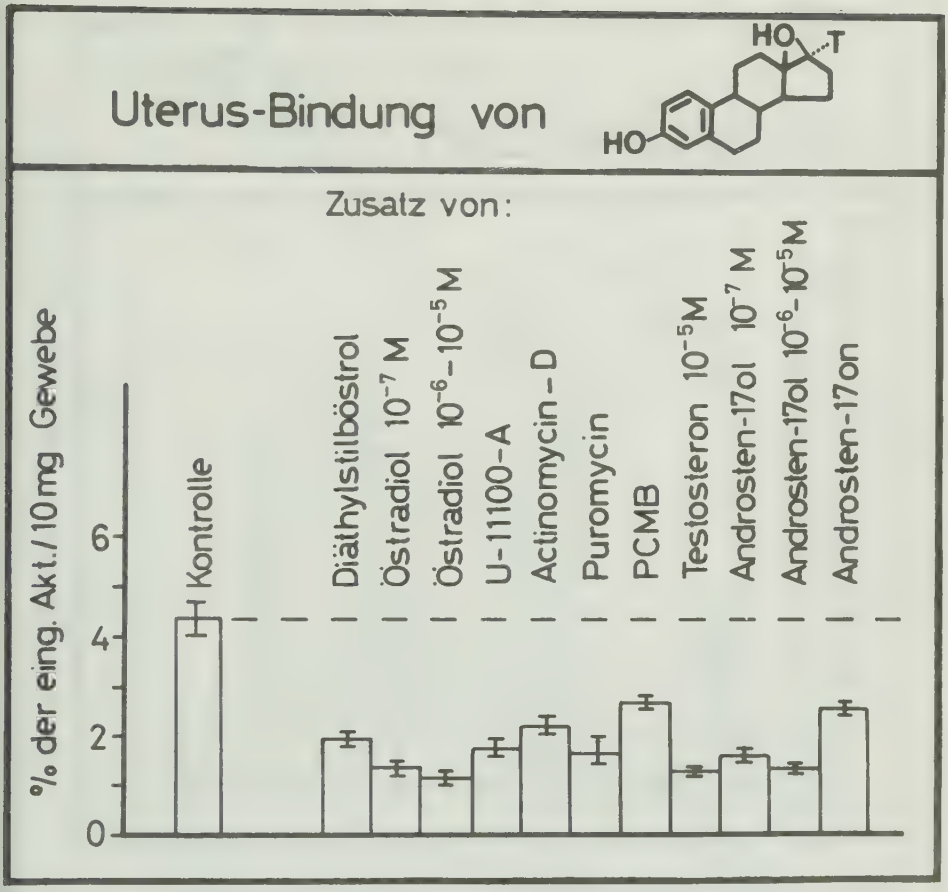


Abb. 21 Inhibierung des Tritium-Einbaus aus 17aT-Östradiol in uterines Gewebe infantiler Ratten

Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung der Ansätze siehe Methodik.
Konzentrationen: 17aT-Östradiol: 3,2 x 10^{-9}Mol/l, inaktive Steroide s.o., Diäthylstilböstrol: 1µg/ml, Actinomycin D und Puromycin: 10µg/ml, PCMB = p-Chlormercuribenzoat: 1 x 10^{-3}Mol/l, U-11100 A: 20µg/ml
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität / 10mg Feuchtgewicht des Gewebes, Mittelwert $\pm$ s (n = 5)

Die Inkubationen mit 10^{-5} und 10^{-6}Mol/l Androsten-17ol und Östradiol ergaben das gleiche Ergebnis.

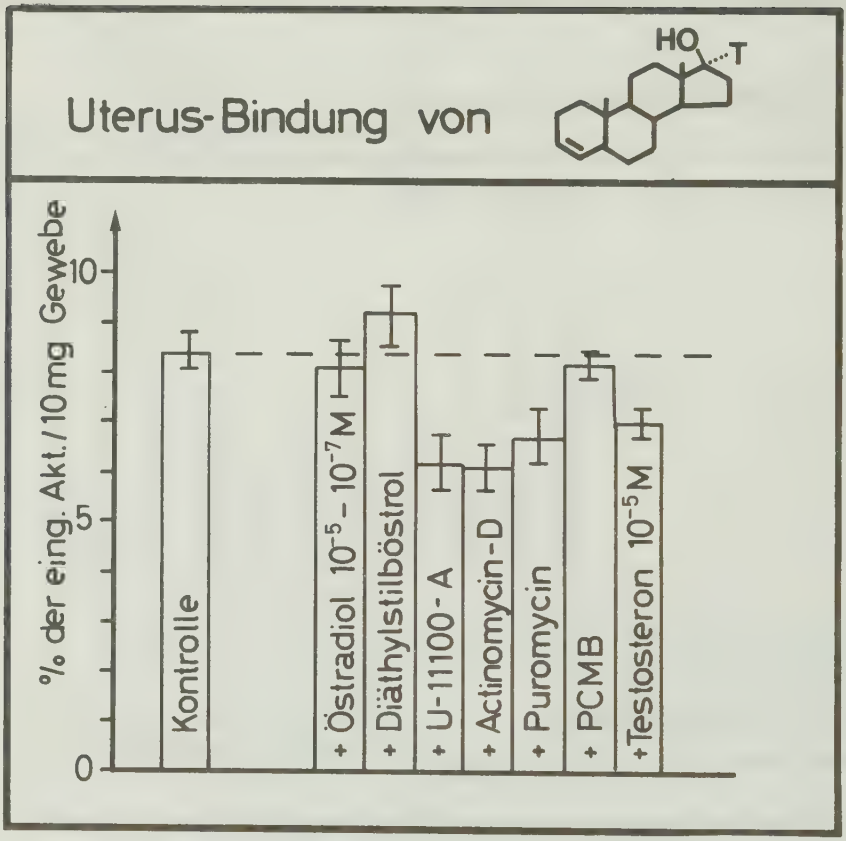


Abb. 22 Inhibierung des Tritium-Einbaus aus 17aT-Androsten-17ol in uterines Gewebe infantiler Ratten

Inkubationsbedingungen, Konzentrationen und Aufarbeitung der Ansätze siehe Methodik und Abb.21
Es wurde 3,0 x 10^{-9}Mol/l 17aT-Androsten-17ol im Ansatz verwandt.
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität /10mg Feuchtgewicht des Gewebes, Mittelwert $\pm$ s (n = 5)
Die Inkubationen mit 10^{-7} - 10^{-5}Mol/l Östradiol ergaben das gleiche Ergebnis.

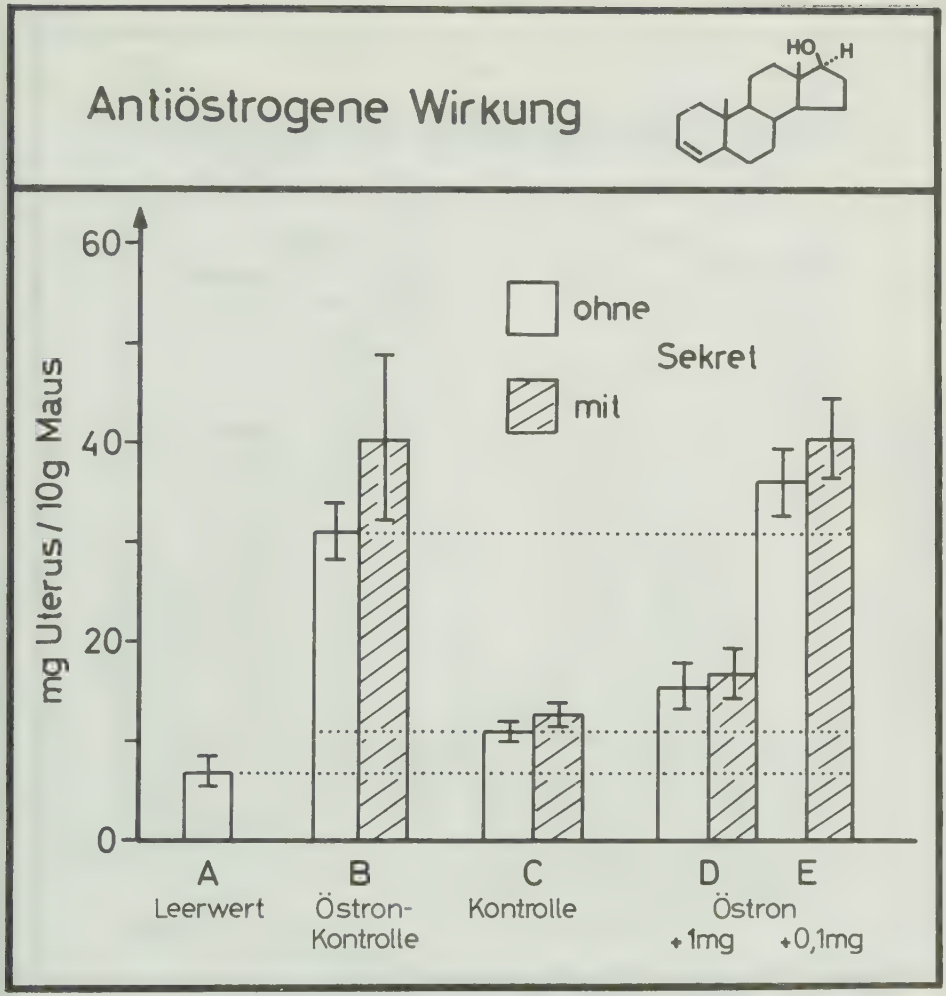


Abb. 24 Antiöstrogene Wirkung von Androsten-17ol bei Östron-induziertem Uteruswachstum

Tiermaterial: infantile Mäuse im Gewicht von 13-15g (23 Tage alt), pro Dosis 10 Tiere
A: Ölkontrolle mit 3 x 0,1ml Rizinusöl s.c.
B: Östron-Kontrolle mit 3 x 0,1µg Östron in 0,1ml Rizinusöl/Benzylbenzoat s.c.
C: Kontrolle mit 1,0mg Androsten-17ol s.c.
D: Wirkungstest mit 3 x 0,1µg Östron + 1mg Androsten-17ol in 0,1ml Rizinusöl/Benzylb. s.c.
E: Wirkungstest mit 3 x 0,1mg Androsten-17ol s.c.
Ordinate: mg Uterusgewicht/10g Maus, Mittelwert $\pm$ s (n = 10), Bedingungen siehe Methodik

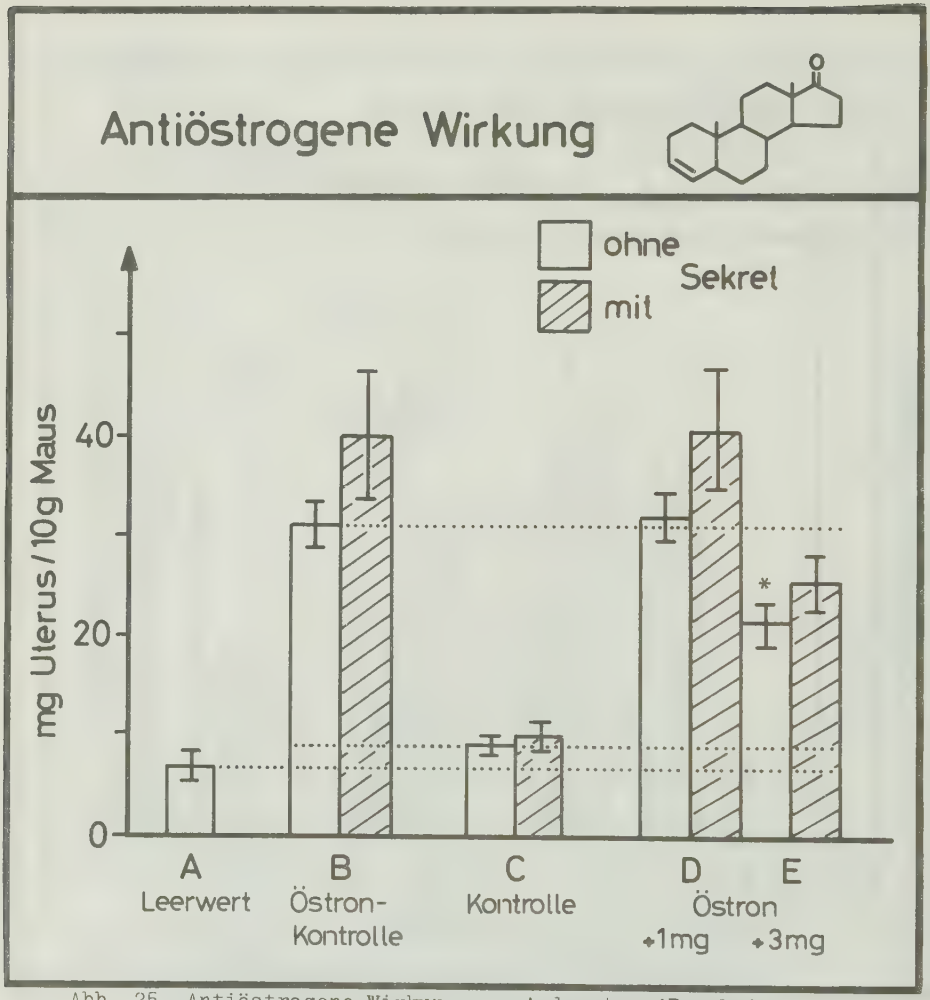


Abb. 25 Antiöstrogene Wirkung von Androsten-17on bei Östron-induziertem Uteruswachstum

Tiermaterial: infantile Mäuse im Gewicht von 13-15g (23 Tage alt), pro Dosis 10 Tiere (s. Meth.)
A: Ölkontrolle mit 3 x 0,1ml Rizinusöl s.c.
B: Östron-Kontrolle mit 3 x 0,1µg Östron in 0,1ml Rizinusöl/Benzylbenzoat s.c.
C: Kontrolle mit 3 x 1,0mg Androsten-17on s.c.
D: Wirkungstest mit 3 x 0,1µg Östron + 1,0mg Androsten-17on in 0,1ml Rizinusöl/Benzylb. s.c.
E: Wirkungstest mit 3 x 3,0mg Androsten-17on s.c.
Ordinate: mg Uterusgewicht/10g Maus, Mittelwert $\pm$ s ($n = 10$), Signifikanz gegenüber dem Östron-Kontrollwert: $^{+}p = 0{,}003$ (T-Test).

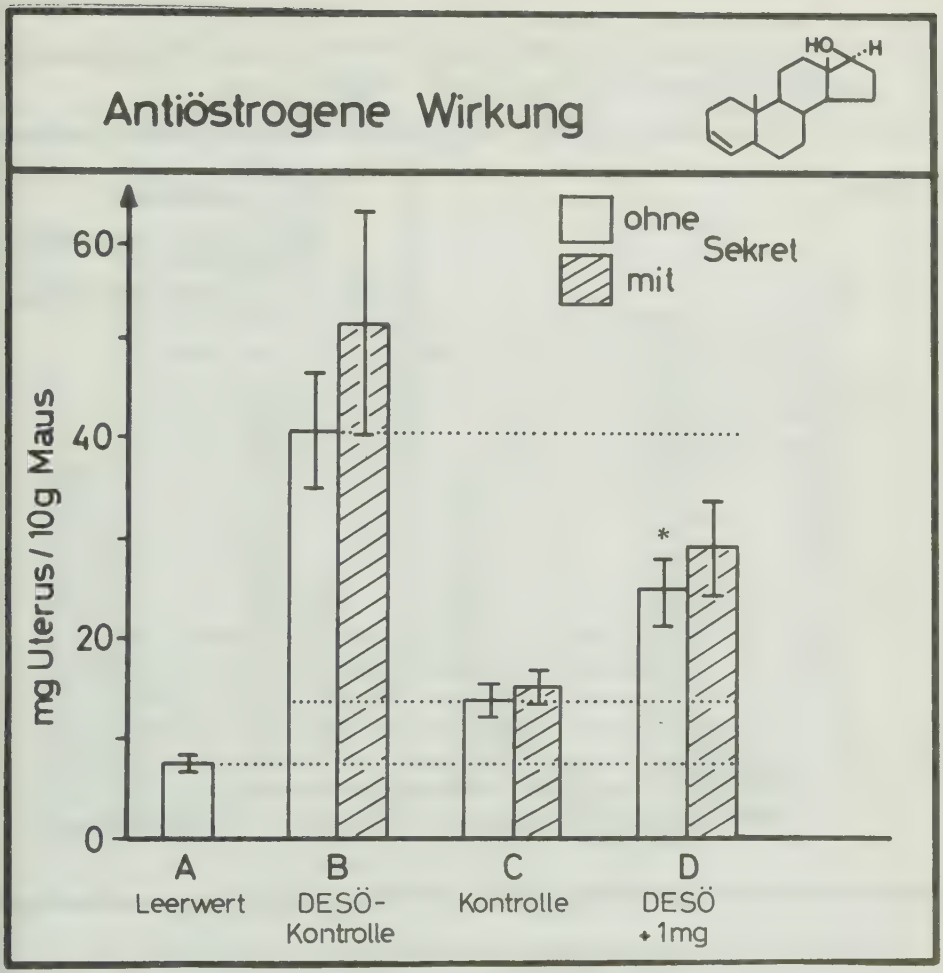


Abb. 26 Antiöstrogene Wirkung von Androsten-17ol bei Diäthylstilböstrol-induziertem Uteruswachstum

Tiermaterial: Bedingungen siehe Abb.25 u. Meth.
A: Ölkontrolle mit 3 x 0,1ml Rizinusöl s.c.
B: DESÖ-Kontrolle mit 3 x 0,1µg Diäthylstilböstrol in 0,1ml Rizinusöl/Benzylbenzoat s.c.
C: Kontrolle mit 3 x 1,0mg Androsten-17ol in 0,1ml Rizinusöl/Benzylbenzoat s.c.
D: Wirkungstest mit 3 x 0,1µg DESÖ + 1mg Androsten-17ol in 0,1ml Rizinusöl/Benzylb. s.c.
Ordinate: mg Uterusgewicht/10g Maus, Mittelwert + s (n = 10), Signifikanz gegenüber dem DESÖ-Kontrollwert: +p = 0,0005 (T-Test).

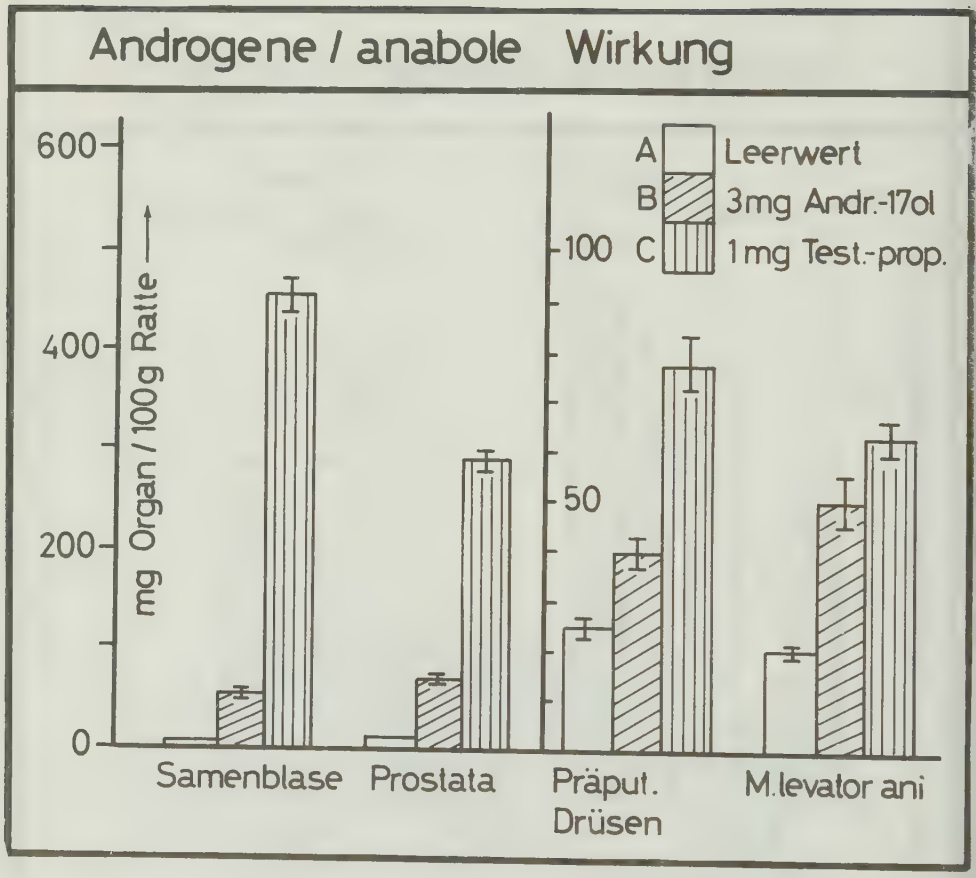


Abb. 27 M. levator ani-, Samenblasen-, Prostata-Test (akute Wirkung)

Tiermaterial: kastrierte männliche Ratten im Gewicht von 90-100g, pro Dosis 6 Tiere.
A: Ölkontrolle mit 12 x 0,2ml Rizinusöl s.c.
B: Wirkungstest mit 12 x 3,0mg Androsten-17ol in 0,2ml Rizinusöl/Benzylbenzoat s.c.
C: TP-Vergleich mit 12 x 1mg Testosteronpropionat in 0,2ml Rizinusöl/Benzylbenzoat s.c.
Ordinate: mg Organgewicht/100g Ratte, Mittelwert $\pm$ s (n = 6)
Einzelheiten der Bedingungen siehe Methodik

6. MATERIAL UND METHODIK

6.1. Material

6.1.1. Tiere

Als Versuchstiere wurden ausgewachsene weibliche und männliche Wistarratten der Fa. Dr. Hagemann, Bösingfeld-Hannover verwendet. Sie waren etwa 150-300g schwer. Infantile Ratten waren 21-25 Tage alt und 30-40g schwer. Infantile Mäuse, die ca. 21 Tage alt waren, wurden über das Gewicht von 13-15g klassifiziert.

6.1.2. Steroide

Die nicht radioaktiv markierten Steroide waren Handelspräparate der Fa. Schering, Berlin, und der Fa. Merck, Darmstadt. Die Steroide wurden dünnschichtchromatographisch auf Reinheit geprüft. 5a-Androst-3-en-17ol/on wurde selbst synthetisiert. In der folgenden Liste sind die in dieser Arbeit verwendeten Steroide aufgeführt:

Progesteron (4-Pregnen-3,20-dion)
Androstendion (4-Androsten-3,17-dion)
Androstandion (5a-Androstan-3,17-dion)
Testosteron (4-Androsten-17ß-ol-3-on)
Testosteronpropionat
Östradiol (Östra-1,3,5-trien-3,17ß-diol)
Östron (Östra-1,3,5-trien-3-ol-17-on)
5a-Androst-3-en-17ß-ol
5a-Androst-3-en-17ß-on
5a-Androst-2-en-17ß-ol
5a-Androstan-3-on-17ß-ol

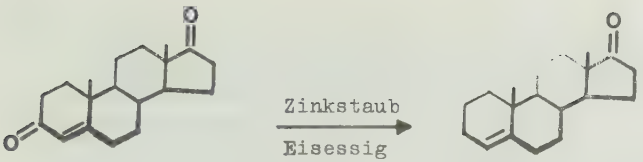
Die radioaktiv markierten Steroide hatten folgende spezifische Aktivitäten:

17a-T-Östradiol	11mCi/µMol	Amersham
6,7-T-Östradiol	40mCi/µMol	Amersham
6,7-T-Östron	40mCi/µMol	Amersham
4-14-C-Östradiol	51µCi/µMol	NEN
4-14-C-Östron	51µCi/µMol	NEN
1,2-T-Testosteron	45Ci/mMol	NEN
4,5,6-T-Androstandion	4,73Ci/mMol	Herst.Pitzel
17a-T-Androst-3-en-17-ol	6mCi/µMol	Amersham
7a-T-Androst-3-en-17-ol	3mCi/µMol	eigene Herst.
7a-T-Androst-3-en-17-on	3mCi/µMol	eigene Herst.
17a-T-Androst-2-en-17-ol	6mCi/µMol	Amersham
7a-T-Androst-4-en-3,17-dion	3mCi/µMol	Amersham

6.1.3. Synthesen von Androsten-17ol/on

aus Androstendion (Lit.105)

Nach einer Vorschrift von McKenna et al. (Lit.105) wurden 330mg Androst-4-en-3,17-dion in 300ml Eisessig mit vier Portionen Zinkstaub zu 15g, im Abstand von jeweils 15 Minuten hinzugegeben, unter Rückfluß erhitzt. Danach wurde dieses Suspensionsgemisch noch 30 Minuten erhitzt, der Zinkstaub abfiltriert und mit Eisessig nachgewaschen. Dem Filtrat wurde Eis hinzugegeben, und die Lösung mit 3N-Natronlauge zu 9/10 neutralisiert. Dann wurde mit Aether erschöpfend extrahiert. Die organische Phase wurde vorsichtig eingeengt und die verbleibende ölige Lösung dünnschichtchromatographisch im System Chloroform/Aceton 90/10 gereinigt. Dabei entstand auf der DC-Platte eine braune Bande unterhalb des R_f= 0,61 von Androst-3-en-17on. (Verunreinigungen, die nicht identifiziert wurden). Die Ausbeute betrug trotz verschiedener Variationen der oben angeführten Vorschrift nur 3% = 10mg des gewünschten Produktes.



Androst-4-en-3,17-dion Androst-3-en-17on

Identität und Reinheit wurden durch Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Fließmitteln überprüft. Die nach der Reinigung durch Umkristallisation in Methanol verbleibende Substanz ergab auf der DC-Platte einen einzigen Substanzfleck, der mit Äthanol/Schwefelsäure 50/50 und Primulinlösung (6.2.3.) unter dem UV-Licht sichtbar wurde. Die R_f-Werte stimmten mit den R_f-Werten eines zum Vergleich aufgetragenen 14C-5a-Androst-3-en-17on von der Schering AG überein (R_f = 0,61).

Dieses unbefriedigende Ergebnis führt Norymbersky (Lit.106) möglicherweise auf die Qualität des verwendeten Zinkstaubs und/oder den Wasseranteil des Eisessigs zurück, wodurch ein unerwünscht großer Anteil von Nebenprodukten entstanden sein kann. Zur Tritierung des Produktes wurde jedoch die auf diese Weise dargestellte Substanz verwandt.

Daraufhin sollte zur Steigerung der Ausbeute an Androsten-17ol/on ein anderer Syntheseweg beschritten werden. Größere Substanzmengen wurden nämlich zur biologischen Testung der Substanz benötigt.

aus Testosteron (Lit.108)

a.) Zur Darstellung nach einer Vorschrift von Caglioti et al. (Lit.108) wurden 10mMol Testosteron in 50ml Diglyme (Diäthylenglykol-dimethyläther at) gelöst. Dann wurde mit einem großen Überschuß von Diboran (Darstellung s.u.) eine Stunde lang am Rückfluß gerührt. Beim Stehenlassen (40 Min.) erstarrte die Masse weiß-

schaumig. Es wurden 25ml Acetanhydrid hinzugefügt und die Mischung eine Stunde lang am Rückfluß unter Rühren gekocht. Alle Syntheseschritte fanden unter Stickstoff statt.Die nun dunkelbraune Reaktionslösung wurde im Vakuum bei 80°C eingedampft. Es entstanden 2,7g eines dunkelbraunen kristallinen Produktes. Dieses wurde mehrmals aus wässrigem Methanol umkristallisiert. Bei den einzelnen Kristallisationsschritten war die überstehende Phase zunächst dunkelbraun und zum Schluß fast klar. Die Rohausbeute des fast weiß-kristallinen Androst-3-en-17ß-acetats betrug 2,2g. Die Identität wurde dünnschichtchromatographisch im Vergleich mit 7aT-Androsten-17-acetat (eigener Herstellung) vorgenommen. Das Acetat hatte einen Substanzfleck vom R_f = 0,58 in Chloroform/Aceton 90/10 (identisch mit 7aT-Androsten-17-acetat), der unter dem UV-Licht sichtbar wurde und mit Äthanol/Schwefelsäure 50/50 anfärbbar war. Das Chromatogramm enthielt noch schwache Banden nicht identifizierbarer Verunreinigungen. Dieses nicht vollkommen gereinigte Androst-3-en-17ß-acetat wurde zur Hydrolyse (b) verwandt.

Diboran wurde folgendermaßen hergestellt:
0,267 Mol eines frisch destillierten Bortrifluoridäthylätherats wurden in 150ml Diglyme gelöst bei 0°C. Ebenso wurde eine 0,1-molare Lösung von Na-Borhydrid in 80ml Diäthylenglykol-dimethylätherat bereitet. Unter Rühren wurde unter N_2 tropfenweise die $NaBH_4$-Lösung der anderen Lösung zugegeben. Mit einem N_2-Strom wurde das sich bildende Diboran in das Reaktionsgefäß der Androsten-17ol-Darstellung übergeführt.

b.) Das Acetat wurde dann mit 5% methanolischer KOH aq. bei Raumtemperatur über 14 Stunden unter leichtem Rühren hydrolysiert. Die Ausbeute an Androsten-17ol betrug etwa 1g = 35% des Ausgangsproduktes Testosteron, was als befriedigend bezeichnet werden kann, da die Me-

thode nicht weiter optimiert wurde. Identität und Reinheit wurden wie oben beschrieben überprüft. Androsten-17ol war im R_f mit 17aT-Androsten-17ol identisch (R_f = 0,40 in Chloroform/Aceton 90/10).

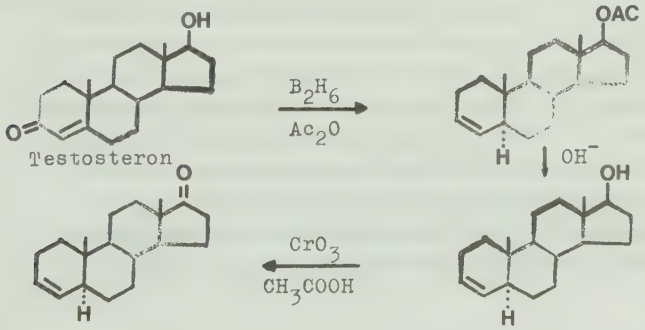
c.) Zur Oxidation wurde etwa 0,5g Androsten-17ol in 20ml Aceton gelöst und mit 8N-Kiliani-Mischung (Lit. 107) bei 20°C behandelt. Nach 15 Minuten wurden 5ml Methanol aq. hinzugegeben, die Lösung in Wasser gegeben und mit Äther extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Einengen der ätherischen Lösung ergab das 460mg eines kristallinen Produktes, das aus wässrigem Methanol mehrmals umkristallisiert wurde und etwa 200mg Androsten-17on ergab. Die Identität und Reinheit wurden wieder wie oben beschrieben überprüft. Das Chromatogramm enthielt nur noch einen Substanzfleck, der mit 7aT-Androst-3-en-17on identisch war. Die Endausbeute betrug etwa 40% des eingesetzten Androsten-17ol.

Die IR-Spektren ergaben ein identisches Bild für Androsten-17ol und Androsten-17on mit Angaben aus der Dissertation W.Mützel (Fachbereich Pharmazie 1970).

Das Massenspektrum ergab für Androsten-17ol ein Molekulargewicht von 274,5, für Androsten-17on von 272,5.

Androsten-17ol hatte einen Schmelzpunkt von 147-150°C und Androsten-17on von 124-126°C (Identisch mit Angaben in Lit.105).

Die Reaktion verläuft nach folgendem Schema:



5a-Androst-3-en-17on

5a-Androst-3-en-17ol

Dieser Syntheseweg wird von den Autoren als spezifisch zur Darstellung eines 5a-Derivates bezeichnet: "Die Abwesenheit der Methylgruppe an C-19 in der Nor-Reihe reduziert die Stereospezifität der Hydroborat-Behandlung vom 4en- zum 3en-Stadium.....Daran ist eine verminderte Abschirmung der Frontseite des Moleküls in der Nor-Reihe schuld und führt zu ß-Derivaten als Nebenprodukt. Der Anteil dieser Nebenprodukte ist jedoch sehr klein, und schmälert den Vorteil dieser Methode nicht."

In einer neuen Veröffentlichung von Djerassi von 1972 (Lit.109) wird die Stereospezifität erneut bestätigt. Einschränkungen werden nur gemacht, wenn mit kleineren Molekülen gearbeitet wird, z.B. bicyclischen Enolen.

Dennoch ergab eine gründliche Analyse durch die Schering AG mittels Gaschromatographie, IR- und NMR-Spektroskopie ein Gemisch aus 50% des 5a-Derivates und 50% des 5ß-Derivates (Lit.110).

Die biologischen Versuche stellen also kein korrektes Bild dar. Dennoch sollte man den Antiöstrogentests eine Bedeutung beimessen, da im Zweifelsfalle nur eine Komponente des verwendeten Steroids gewirkt hat, schließt man aus, daß nur das 50/50 Gemisch der beiden Derivate wirksam ist.

Darstellung von 7aT-Androsten-17on/ol

Die Darstellung von 7aT-Androsten-17on erfolgte nach dem oben beschriebenen Verfahren von McKenna (Lit. 105) aus 500 µCi = 48µg 7aT-Androst-4-en-3,17-dion (spez. Aktivität 3mCi/µMol). Die Ausbeute betrug 28%. Der Cyclohexanextrakt der Steroide wird eingeengt und dünnschichtchromatographisch in Chloroform/Aceton 90/10 gereinigt. Die Identifizierung erfolgte unter dem Dünnschicht-Scanner mit angeschlossenem Punktdrucker.

Zur Reduktion wurde Androsten-17on in 5ml wasserfreiem Methanol gelöst. Nach Zugabe von 10mg Natrium-

borhydrid wird die Lösung eine Stunde bei Zimmertemperatur unter öfterem Umschütteln stehen gelassen. Der Cyclohexanextrakt wird eingeengt und dünnschichtchromatographisch in Chloroform/Aceton 90/10 gereinigt. Die Identifizierung der Produkte erfolgte ebenfalls unter dem Dünnschicht-Scanner mit angeschlossenem Punktdrucker. Die Ausbeute an Androsten-17ol betrug 85% der eingesetzten Androsten-17on-Menge.

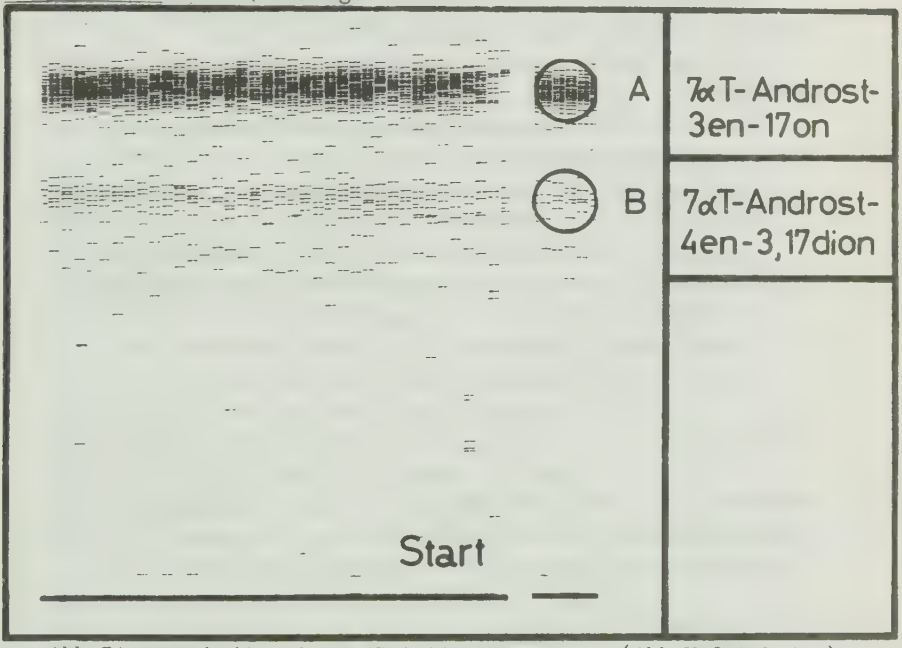


Abb.31 Ausschnitt eines "Szintigrammes" (Abb.Maßstab 1:1)

Darstellung der DC-Trennung von 7aT-Androst-3-en-17on (A) und 7aT-Androst-4-en-3,17-dion (B)
Ansatz: 48µg 7aT-Androst-4-en-3,17-dion (3mCi/µMol)
Laufmittel: Chloroform/Aceton 90/10
DC-Platte: Kieselgel F 254, Fa. Merck
Start-Front = 17cm, Start-A =10,3cm, Start-B = 7,8cm; danach ergeben sich folgende R_f-Werte: 7aT-Androst-3-en-17on (A) R_f=0,61, 7aT-Androst-4-en-3,17-dion (B) R_f=0,52

6.1.4. Reagentien, Coenzyme, Lösungsmittel, Substrate

Die Reagentien waren vom Reinheitsgrad p.a. der Fa. E.Merck, Darmstadt. Die organischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und vor Licht geschützt aufbewahrt. Die Chemikalien zur Szintillationsmeßtechnik wurden von der Fa. Beckman Inc. bezogen.

Die Dünnschichtplatten wurden von der Fa. E.Merck bezogen: Fertigplatten Kieselgel F 254.

NAD und NADP stammten von der Fa. C.F.Boehringer, Mannheim.

Die Herkunft der anderen Substrate ist wie folgt:
Diäthylstilböstrol (Fa. Gayer, Berlin)
Actinomycin D (Fa. Serva, Heidelberg)
Puromycin (Fa. Serva, Heidelberg)
U-11100 A (1-(2-(p-(3,4-Dihydro-6-methoxy-2-phenyl-1-naphthyl)phenoxy)äthyl)pyrolidin-hydrochlorid) (The Upjohn Comp. Kalamazoo, Mich. USA)
p-Chlormercuribenzoat
Soluene TM-100 (Fa. Packard)

6.1.5. Puffer

Gewebeschnitte: Krebs-Ringer-PO_4 mit 1mg Glucose/ml pH 7,4
Gewebehomogenat: TRIS-HCL-puffer pH 7,4
Sörensen-Phosphat-Puffer pH 5,23-6,79

6.1.6. Injektionslösungen

Die Verbindungen wurden in 90% Äthanol gelöst und bei $-20^{o}C$ vor Licht geschützt aufbewahrt. Zur besseren Verträglichkeit wurde Äthanol/NaCL physiolog. 50/50 verwandt.

Für die biologischen Versuche wurden die Injektionslösungen folgendermaßen bereitet: Die Steroide wurden in einer geringen Menge Benzylbenzoat heiß gelöst und mit Rizinusöl bis zur gewünschten Konzentration verdünnt.

6.2. Methodik

6.2.1. Gewebeinkubationen

Nach Narkotisieren wurden die Tiere getötet. Nach dem Ausbluten wurden die Organe zur Gewinnung von Schnitten bzw. Homogenat entnommen und sofort in entsprechende eiskalte Pufferlösungen überführt.

Zur Herstellung von Schnitten wurden die Organe (Leber, Niere, Hoden) auf dem Eisblock mit der Rasierklinge in etwa 0,5mm dünne Scheiben geschnitten. Die Ansätze betrugen ungefähr 100mg Gewebematerial.

Diaphragma, Ovar und Vagina wurden mit der Schere zerkleinert. Die Bindegewebsschicht am Uterus wurde mit der Pinzette abgezogen, bei infantilen Tieren die beiden Uterushörner der Länge nach gespalten und insgesamt verwandt, während bei erwachsenen Tieren die Uterushörner noch zerkleinert wurden.

Zur Homogenat-Herstellung wurde 1,0g entblutete Leber mit der Schere zerkleinert und in 30,0ml Puffer unter Eiskühlung mit einem Potter-Homogenisator bei 400 U/Min. homogenisiert. Davon wurden je 3,0ml entsprechend 100mg Leber pro Ansatz eingesetzt.

Die Zeit zwischen dem Exitus der Tiere und dem Inkubationsbeginn betrug nicht mehr als 15 Minuten.

Zur Uterus-Homogenat-Herstellung wurde der Uterus mit der Schere zerkleinert, nachdem er vorher der Länge nach gespalten wurde. Das Gewebe wurde in Phosphat-Puffer eingebracht und unter Eiskühlung mit einem Atomixmill der Fa. G.Lahl, Müllheim, homogenisiert.

Die jeweils in 0,1ml Äthanol gelösten Steroide wurden mit den in 3,oml Puffer befindlichen Gewebeteilen in dicht verschlossenen runden Gläschen von 20ml Inhalt durchmischt und dann sofort im Warburg'schen Schüttelthermostaten bei 37°C die jeweils vorgeschriebenen Zeiten lang geschüttelt.

Bei Gewebeinkubationen mit Zellmaterial infantiler

Tiere zum Studium der Aktivitätsaufnahme in diesen Geweben, wurden die Gewebestücke nach der Hauptinkubation aus den Inkubationsansätzen entnommen und nach dem Abspülen nochmals 60 Minuten bei 25°C mit der 100-fachen Menge der verwandten inaktiven Steroide nachinkubiert.

Danach wurden die Reaktionen durch sofortiges Einbringen der Gefäße in Eiswasser gestoppt. Der gesamte Inhalt der Gefäße wurde in Zentrifugengläser überführt und mit 3ml Chloroform nachgespült. Gleichzeitig wurde mit dem Chloroform der Inkubationsansatz extrahiert, bei 3000 U/Min. zentrifugiert und das Chloroform mit einer Pipette vom Boden abgesaugt. Spülen und Extrahieren wurden dreimal wiederholt. Die Zellextrakte wurden vereinigt und im Druckluftstrom bei leichter Erwärmung bis 40°C auf dem Wasserbad bis zur Trockne eingedampft.

HTO wurde nach dem Alkalisieren der Überstände durch Gefrierdestillation gewonnen.

6.2.2. Dünnschichtchromatographie

Die zur Trockne eingedampften Gewebeextrakte wurden dreimal mit je 0,1ml Aceton auf eine 0,25mm dicke nicht aktivierte DC-Fertigplatte aufgetragen. Die Chromatogramme wurden aufsteigend u.a. in fogenden Systemen entwickelt:

1.	Chloroform/Aceton	90/10
2.	Äther/Dimethylformamid	99/1
3.	Chloroform/Methanol	90/10 (Vol.-Teile)

6.2.3. Identifizierung der Metabolite

Die Lage der radioaktiven Steroide wurde durch direkte Aktivitätsmessung mit dem Dünnschichtscanner II, kombiniert mit Autochronschreiber, ermittelt (Lit.116).

Die Lage der gleichzeitig aufgetragenen inaktiven Referenzsubstanzen wurde entweder im UV-Licht sichtbar gemacht oder durch Ansprühen der DC-Platte mit Äthanol/Schwefelsäure 50/50 oder mit Primulinlösung (1ml einer Stammlösung = 0,1g/100ml H_2O mit 100ml Aceton/Wasser

4/1 (Lit.111)

Die Aktivitätsgipfel der Kurven wurden quantitativ planimetrisch bzw. mit Hilfe einer besonderen Integrationskurve ausgemessen.

Die Zählausbeuten lagen,bei einem Abstand des Zählrohres von 0,5mm von der Oberfläche der DC-Platte, für Tritium bei 1% und für C_{14} bei 20%, bei Verwendung einer Blende mit Fenster bei 7%.

Die Wiederfindung der Steroide aus biologischem Material betrug 85-90%.

Zur weiteren Identifizierung der Metabolite wurde eine Veränderung der radioaktiven Maxima durch chemische Reaktionen benutzt. Hierzu wurden die Maxima von der Platte abgeschabt und extrahiert. Die Extraktionsrückstände wurden folgenden Reaktionen unterworfen:

Zur Acetylierung wurde die getrocknete Substanz in einem Tropfen wasserfreiem Benzol gelöst und mit 0,05ml Acetanhydrid und 0,05ml frisch destilliertem Pyridin 2 Stunden bei 60°C erwärmt.

Die Oxidation von Hydroxylgruppen wurde mit 3% Chromtrioxyd in Eisessig durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Zimmertemperatur aufbewahrt und dann mit Methylenchlorid extrahiert.

Zur Reduktion wurden die Steroide in 0,5ml wasserfreiem Methanol gelöst und mit 1,5µMol Natriumborhydrid 2 Stunden bei Zimmertemperatur reduziert.

6.2.4. Flüssig-Szintillationsmessung

Die reinen radioaktiven Lösungen, das Tritium-Wasser und die abgeschabten Maxima der DC-Platten wurden mit Hilfe von Dioxan-Szintillationslösungen (2,5-Diphenyloxazol 5g, Naphthalin 100g, Dioxan ad 1 Liter) in einem Flüssig-Szintillationsmeßgerät der Fa.Beckman gemessen. (Nach Gewebeauflösung mit Soluene wurde mit Toluol PPO gemessen). Für Tritium und C_{14} wurden jeweils verschiedene Energiekanäle benutzt, die Zählausbeute durch externen

Standart bestimmt. Die von der DC-Platte abgeschabten Mengen an Radioaktivität wurden mit Hife eines internen Standarts bestimmt.

Die Errechnung der Mittelwerte mit Standartabweichung erfolgte über einen Lochstreifenleser mit einem Olivetti Tischrechner P101.

6.2.5. Radiospirometrie

Diese Methode beruht auf der stoffwechsel-labilen Markierung mit Tritium und der Messung von Umsatzquoten im Organismus durch Bestimmung der Tritiumaktivität im Atemwasser (Lit.61).

Der Bestimmung der Androsten-17ol-Oxidation liegt folgende Reaktionsgleichung zugrunde:

17aT-Androsten-17ol + NAD/NADP $\xrightarrow{\text{17ß-OH-St.-DH}}$

Androsten-17on + NADT/NADPT $\xrightarrow{\text{Atmungskette}}$ HTO i. Körperwasser

Versuchsanordnung: Die entsprechende Menge Steroid wurde intramuskulär injiziert. Je zwei Tiere wurden danach sofort in einen speziellen zylindrischen Plexiglaskäfig gesetzt, dem mit Schwefelsäure und Calciumchlorid getrocknete Luft zugeführt wurde. Der in der ausgeatmeten Luft der Tiere enthaltene Wasserdampf wurde in Kühlfallen, die mit flüssiger Luft gekühlt wurden, ausgefroren. Die Kühlfallen wurden in bestimmten Zeitabständen gewechselt. Aus den Wasserproben wurde direkt die spezifische Aktivität in µCiT/ml gemessen.

Aus dem Gewicht der Tiere läßt sich das Gesamtkörperwasser berechnen. Es beträgt 64-68% des Gewichts der Tiere (Lit.112).Die Androsten-17ol-Oxidation wird nach folgender Formel berechnet:

$$100 \times \frac{\mu Ci/ml \text{ Atemwasser}}{\mu Ci \text{ inj. } 17aT\text{-A.}/ml \text{ Körperwasser}} = \text{Mindestox.in\%}$$

6.2.6. Antiöstrogentest an Mäusen (Lit.79,80)

Als Versuchstiere dienten etwa 21 Tage alte Mäuse,

die über das Gewicht von 13-15g klassifiziert wurden. Die Untersuchungen erfolgten in vier Gruppen mit je 10 Mäusen. Eine Gruppe erhielt 0,1µg Östron über drei Tage täglich subcutan injiziert, eine andere 0,1µg Östron + 1mg der Testsubstanz; eine Gruppe nur 1mg der Testsubstanz und eine Gruppe nur 0,1ml Rizinusöl. Am Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und das Gewicht der Uteri mit und ohne Sekret ermittelt und auf mg/10g Körpergewicht umgerechnet.

Es wurde die prozentuale Hemmung des Uteruswachstums, bezogen auf die nur mit Östrogen behandelte Kontrollgruppe ermittelt. Dabei wurde das Uterusgewicht der unbehandelten Kontrollgruppe von dem entsprechenden Gewicht der Östrogenkontrolle abgezogen. Auf den so erhaltenen Kontrollwert wurden die Werte der Testsubstanzgruppe nach Abzug der Gewichte der unbehandelten Gruppe bezogen. Die Berechnung der prozentualen Hemmung erfolgte nach der folgenden Formel:

$$100 - \left[\frac{(\text{Wert behandelter Tiere}) - (\text{Wert unbeh.Kontr.})}{(\text{Wert d. Östrogenkontr.}) - (\text{Wert unbeh.Kontr.})} \times 100 \right]$$

6.2.7. Östrogentest nach Allen-Doisy (Lit.78)

6 kastrierten Rattenweibchen wurden je 10mg der Testsubstanz subcutan gespritzt, und zwar an zwei verschiedenen Körperstellen wegen der Menge der Injektionslösung. Am dritten Tage nach der Injektion wurden zweimal im Abstand von fünf Stunden Vaginalabstriche gemacht und sofort unter dem Mikroskop klassifiziert. Diese Abstriche wurden noch an zwei Tagen wiederholt. Spritzen und Abstreichen geschah ohne Narkose. Die Beurteilung des Zyklusstadiums geschah nach folgendem Schema.

6.2.8. Bestimmung der Zyklusphasen bei Ratten (Lit.113,114)

Die Vaginalabstriche wurden mit einem Wattestift vorgenommen und auf einen Objektträger gebracht, an der Luft

getrocknet und fünf Sekunden mit Methanol fixiert. Dann wurde mit Giemsa 1:20 gefärbt, mit Wasser gespült und an der Luft getrocknet. Das mikroskopische Bild des Vaginalabstriches wurde nach folgenden Gesichtspunkten klassifiziert:

Diöstrus (Ruhepause, 50-60 Stunden)
wenige kernhaltige Epithelzellen, einige Leukozyten und Schleim

Proöstrus (mittlere Zeitdauer 12 Stunden)
kein Schleim, wenig Leukozyten, viele kernhaltige Epithelzellen

Östrus (Brunstzeit, 10-18 Stunden)
im frühen Östrus neben kernlosen, keratinisierten Vaginalschollen meist einzeln liegende kernhaltige Oberflächenzellen; im späten Östrus verklumpte sehr charakteristische Schollen vorherrschend, vereinzelt wieder Leukozyten

Metöstrus (Nachbrunstzeit, 24-30 Stunden)
wieder zahlreiche Leukozyten, keine Schollen, Auftreten von basalen Epithelzellen

6.2.9. M.levator ani-,Samenblasen-, Prostata-Test (akute Wirkung) (Lit.81)

Es wurden kastrierte männliche Tiere im Gewicht von 90-100g, pro Dosis 5 Tiere, verwandt. Vom 7. Tage nach der Kastration an erhielten sie zwölfmal innerhalb von 14 Tagen die zu testende Substanz, 3mg pro Tier pro Tag. Als Referenzsubstanz erhielten sie 1mg Testosteronpropionat appliziert. Am Tage nach der letzten Applikation wurden die Tiere getötet, die Frischgewichte folgender Organe ermittelt und auf mg/100g Körpergewicht umgerechnet: Samenblase, Prostata und M.levator ani; außerdem Präputialdrüsen und Nebennieren. Zur Auswertung werden neben den absoluten Zahlen die relativen Wirkungen angegeben. Hierzu wurden M.levator ani-Werte zwischen 25 und 50mg/100g Körpergewicht und Samenblasen-Werte zwischen 150 und 400mg/100g Körpergewicht verwandt.

Die Dissoziation zwischen anaboler und androgener Wirkung gibt der Quotient Q an, der nach folgender Formel errechnet wird:

$$Q = \frac{\text{rel. anabole Wirkung}}{\text{rel. androgene Wirkung}}$$

Bei der Referenzsubstanz Testosteronpropionat ist Q definitionsgemäß = 1. Je größer Q, desto günstiger in Richtung anabol ist die Dissoziation zwischen anaboler und androgener Wirkung.

Der Test ist für Androgene spezifisch. Die Verwendung des M.levator ani ist umstritten.

6.2.10. Gefriertrocknung und Verbrennung

Zur Feststellung der Steroid-Bindung im Gesamtuterus wurden die Uteri getrocknet. Das Trocknen der Uterusstücke muß durch Gefriertrocknung erfolgen. Nur dadurch erhält man Werte, die mit den Werten übereinstimmen, die durch Gewebeauflösung z.B. Soluene TM 100 gewonnen werden. Wird das Gewebe im Trockenschrank bei 60°C getrocknet, so wird beim Durchlaufen des Temperaturbereiches von 35-45°C 17aT-Steroid im Gewebe enzymatisch zu HTO oxidiert, das verdampft. Man findet daher bei der Trocknung im Trockenschrank zu kleine Aktivitätswerte.

Die Gefriertrocknung erfolgte (in einem Gerät der Fa.Christ) über 24 Stunden in einem Temperaturbereich von -40-+10°C. Anschließend wurde automatisch im Mikromat BF 5010 der Fa.Berthold & Friesecke, Karlsruhe-Durlach, verbrannt. Zur Verbrennung wurden Meßgläschen aus Glas benutzt, die mit Sauerstoff gespült wurden und in denen auch die Messung im Flüssig-Szintillations-Zähler erfolgte. Das bei der Verbrennung entstandene Tritium-Wasser wurde in 0,5ml H_2O absorbiert und mit Szintillatorlösung aufgefüllt. Zur Ermittlung des Nullwertes wurde jeweils ein radioaktivitätsfreier Uterus verbrannt.

Zur Bestimmung der Aktivitätsbindung in verschiedenen Geweben wurden Organe und Körperflüssigkeit nach

der Entnahme sofort eingefroren und danach 48 Stunden gefriergetrocknet. Ein Teil des getrockneten Gewebes wurde mit 1ml Soluene TM 100 in einem Szintillationsgläschen aufgelöst und 2 Stunden auf 60°C erwärmt. Anschließend wurden 10ml Szintillationslösung, ferner 25ml konz. Essigsäure zur Neutralisation des Soluene hinzugefügt. Die Proben wurden bis zur konstanten Impulsrate gemessen.

6.2.11. Fraktionierung des Uterusgewebes

a. kalter Perchlorsäureextrakt: Der Uterus wurde mit 1 ml 3% $HClO_4$ 10 Minuten bei 0°C extrahiert, dekantiert und mit 0,5ml 3% $HClO_4$ erneut 10 Minuten bei 0°C extrahiert. Bei 0°C wurde mit gesättigter KOH neutralisiert, zentrifugiert und der Überstand gemessen.
b. Lipoide: Der Zellrückstand von a. wurde mit 0,5ml Äthanol versetzt, 5 Minuten auf 70°C erhitzt, zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Der Rückstand wurde schließlich 5 Minuten bei 60°C mit 2 ml Äthanol/Äthyläther 3/1 behandelt. Zum Schluß wurde der Zellrückstand mit 3,0 ml Äthyläther gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden zur Trockne eingeengt und mit Äthanol aufgenommen. In einem Aliquot wurde die Radioaktivität bestimmt.
c. heißer Perchlorsäureextrakt: Der Rückstand von b. wurde zweimal mit je 0,5 ml 10% $HClO_4$ 20 Minuten bei 70°C auf dem Wasserbad erhitzt, dekantiert, bei 0°C mit KOH neutralisiert, abzentrifugiert und der Überstand gemessen.
d. Proteine: Nach dem Waschen des Rückstandes von c. mit Wasser, Äthylalkohol und Äthyläther wurde er über Silicagel getrocknet. Danach wurde zum getrockneten Rückstand 1 ml Soluene TM 100 gegeben und 2-3 Stunden auf maximal 60°C erhitzt. Danach hatte sich das Protein vollständig gelöst. Der Lösung wurden 10 ml Szintillationsmischung hinzugegeben und bis zur konstanten Impulsrate gemessen. (Lit.115)

6.2.12. Morphologische Fraktionierung des Gewebes

Das Gewebehomogenat wurde in der Beckman Ultrazentrifuge bei 10 000 x g zentrifugiert. Das Zentrifugat,das verworfen wird, besteht aus Zellkernen und Mitochondrien. Der Überstand wird erneut 45 Minuten bei 110 000 x g zentrifugiert. Das Zentrifugat für die Herstellung reiner Mikrosomen wird wie folgt gereinigt (Der Überstand = Cytoplasma-Fraktion wird direkt zur Inkubation verwandt) :
Zur Lösung von Verunreinigungen werden die Mikrosomen noch zweimal mit 5 ml Tris-Puffer suspensiert und je 45 Minuten bei 110 000 x g zentrifugiert und in Tris-Puffer anschließend homogenisiert.

7. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob der von Wenzel et al. gefundene biochemische Antagonismus zwischen Hydroxy- und Ketosteroiden auch für Androsten-17ol und Östron Anwendung findet.

Ein Schwerpunkt der Arbeit liegt auf der Ermittlung konstitutiver Gesetzmäßigkeiten für die Wasserstoff-Übertragung von 17aT-Androsten-17ol auf Östron in Stoffwechselorganen männlicher und weiblicher Ratten. Dabei ergab sich keine deutliche Substratspezifität für Östron im Vergleich zu anderen 17-Ketosteroiden. Es wird gezeigt, daß es sich hierbei um eine enzymatische Reduktion eines 17-Ketosteroides durch den Wasserstoff handelt, der von der 17-Stellung eines Hydroxy-Steroides abgelöst wurde. Die Reaktion ist NAD- bzw. NADP-abhängig.

Der Wasserstoff-Transfer wurde nur in Leber und Niere gefunden, die Sexualorgane zeigen hingegen keinerlei Enzymaktivität im Sinne der Aufgabenstellung.

Das pH-Optimum des Transfers wurde mit 7,3 ermittelt. Versuche über die Konzentrationsabhängigkeit zeigten, daß sich ein Gleichgewicht der Reaktion bei Konzentrationen im Verhältnis von 1:1 zwischen Donator- und Akzeptor-Steroid einstellt. Die Zugabe eines zweiten reduzierbaren 17-OH-Steroids wirkt verlangsamend, die Zugabe eines 17-Oxosteroids mit Einschränkungen beschleunigend auf die Oxidation des Androsten-17ol in vivo und in vitro, Befunde,die mit der Östradiol-Oxidation übereinstimmen.

Ein weiterer Schwerpunkt war die Untersuchung der Wirkung von Androsten-17ol auf den Uterus der Ratte und die Beeinflussung der Östradiol-Wirkung auf das Erfolgsorgan. Es ergab sich eine eindeutige Beeinflussung durch

Androsten-17ol.

Androsten-17ol wird etwa doppelt so stark in den Uterus eingebaut wie Östradiol, die Affinität zu anderen Organen der Ratte ist vergleichsweise geringer. Dabei entsprachen die in vivo-Einbauraten für Östradiol den Befunden der Literatur, der in vivo-Einbau des Androsten-17ol zeigt ein anderes Aufnahmemuster. Östradiol verbleibt über mehrere Stunden im Uterus, während in den anderen Geweben ein schneller Aktivitätsabfall eintritt. Androsten-17ol wird ebenfalls rasch vom Uterus aufgenommen, jedoch wie in den übrigen Organen ebenso rasch wieder freigegeben.

Dabei wird Androsten-17ol als Gesamtmolekül in den Uterus eingebaut. Bei einer Fraktionierung des Gewebes findet man das gesamte Androsten-17ol in der Fraktion der Lipoide wieder.

Andere zum Vergleich herangezogene Steroide aus der C-19-Reihe zeigen keine Uterusaffinität in vitro, wie dies für Androsten-17ol gefunden wurde.

Östradiol wird im physiologischen Bereich von 10^{-9}Mol/l spezifisch an den Uterus gebunden. Eine Erhöhung der Steroidkonzentration bringt keine prozentuale Steigerung der Steroid-Inkorporation. Danach hat der Uterus nur eine begrenzte Kapazität für Östradiol (Rezeptor-Kapazität), nicht dagegen für Androsten-17ol.

Inhibierungsstudien weisen für Östradiol auf eine Bindung an "Rezeptoren". Für Androsten-17ol unterbleibt eine solche Rezeptor-bedingte Bindung. Dennoch ist Androsten-17ol seinerseits in vitro in der Lage, die Uterusbindung des Östradiol zu inhibieren. Das war auch mit Östrogenantagonisten wie Rezeptorblockern und Substraten, die die Konformation der Rezeptoren verändern und dadurch eine Bindung inhibieren, für Östradiol möglich.

Die endokrinologischen Befunde ergänzen das Bild der biochemischen Ergebnisse. Androsten-17ol wirkt selbst nicht östrogen. Die androgene Wirkung ist gering und selbst die anabole Wirkung ist verhältnismäßig gering. Dagegen

wirkt es eindeutig antiöstrogen, d.h. nach den vorliegenden Ergebnissen inhibiert es das Östron-induzierte Uteruswachstum erheblich.

Zum Schluß wird eine Beeinflussung östrogenabhängiger Prozesse in bezug auf den Uterus und andere Hormon-induzierte und -abhängige Vorgänge an z.B. Karzinomen der Mamma diskutiert. Eine Verwendung des Androsten-17ol erscheint hier in gewisser Weise vergleichbar mit in der Therapie eingeführten Östrogenantagonisten und Hormonen, die diese Vorgänge stärker beeinflussen. Hiernach scheint Androsten-17ol geeignet zu sein, in den Östrogen-Stoffwechsel regulierend einzugreifen, ohne durch eine Eigenwirkung als Androgen oder Östrogen zu stören.

8. LITERATUR

1	Wenzel,M.,Pollow,K., Ziebarth,T.	Z. Naturforschung 22b, (1967) 894
2	Wenzel,M.	Biochim.Biophys.Acta 152, (1968) 431
3	Wenzel,M.,Langold,M., Hallac,P.	J.Biol.Chem. 244, (1969) 4523
4	Wenzel,M.,Mützel,W.	Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 351, (1970) 1221
5	Wenzel,M.,Hieronimus,B.	Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 353, (1972) 1477-1486
6	Leybold,K.,Staudinger,H.J.	Biochem.Zeitg. 331, (1959) 389
7	Albaum,G.,Staib,W.	Biochem.Zeitg. 342, (1965) 120
8	Schriefers,H.,Cremer,W. Otto,M.	Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 348, (1967) 183
9	Schriefers,H.,Pohl,F., Pittel,M.	Acta endocrinol.(Copenhagen) 40, (1962) 40
10	Hübener,H.J.,Amelung,D.	Z.physiol.Chemie 293, (1953) 137
11	Jensen,E.V.,Jacobson,H.J.	Recent Progr.Hormone Res. 18, (1967) 387
12	Jütting,G.	Acta endocrinol.(Copenhagen) 64, (1970) 145
13	Lehmann,W.D.,Breuer,H.	Naturwissenschaften 55, (1968) 182
14	Wenzel,M.,Wolf,S., Bollert,B.	Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 352, (1971) 1248-1250
15	Staib,W.,Dönges,K., Teller,W.	Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 324, (1961) 32

16 Berliner,D.L.,Leong,G.F., Cazes,D.M.,Berliner,M.L. Amer.J.Physiol. 202, (1962) 420

17 Zeis Thomas,P.,Dorfman,R.I. J.Biol.Chem. 239, (1964) 766

18 Breuer,H.,Dahm,K. Biochem.Biophys.Acta (Amst.) 85, (1964) 29

19 Dahm,K.,Breuer,H. Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 336, (1964) 63

20 Layer,L.J.,Engel,L.L. J.Biol.Chem. 233, (1958) 583

21 Jarabak,J.,Adams,J.A., Williams-Ashman,H.G., Talalay,P. J.Biol.Chem. 237, (1962) 345

22 Döllefeld,E.,Breuer,H. Biochem.Biophys.Acta (Amst.) 124, (1966) 187

23 Hecker,E.,Betz,D. Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 338, (1964) 260

24 Maas,H.,Bettendorf,G., Schulz,K.D. Arch.Gynäk. 202, (1965) 228

25 Lisboa,B.P.,Breuer,H. Gen.comp.Endocr. 6, (1966) 114

26 Lehmann,W.D.,Breuer,H. Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 348, (1967) 1633

27 Endahl,G.L.,Kochakian,C.D., Hamm,D. J.Biol.Chem. 235, (1960) 2792

28 Kochakian,C.D. Proc.4th Int.Congr.Biochem. Vienna Vol.IV,Perg.Press.Lond.

29 Breuer,H.,Ozon,R., Mittermeyer,C. Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 333, (1963) 272

30 Villée,C.A.,Spencer,J.M. J.Biol.Chem. 235, (1960) 3615

31 Jütting,G.,Thun,K.J., Kuss,E. Europ.J.Biochem. 2, (1967) 146

32 Villée,C.A.,Hagermann,D. J.Biol.Chem. 233, (1958) 42

33 Talalay,P.,Williams-Ashman,H.G. Recent Progr.Hormone Res. 16, (1960) 1

34 Villée,C.A.	Klin.Wschr. 39, (1961) 173
35 Hecker,E.,Farthoefer-Boeckh.	Biochem.Z. 338, (1963) 628
36 Görlich,M.	Arch.f.Geschwulstfschg. 37 Heft 2 (1971) 161-70
37 Wira,C.R.,Rochefort,H., Beaulieu,E.	Karolinska Sympos.on Research Methods in Reproduct.Endocrin. 3rd Symp. Jan.25-27 (1971)
38 Goodall,F.R.	Arch.Biochem. 112, (1965) 403
39 Schimke,R.T.	Bull.Soc.Chim.Biol. (Paris) 48, (1966) 1009
40 Kinson,G.A., Kochakian,C.D.	Amer.J.Physiol. 206, (1964) 443
41 Noteboom,W.D.,Gorski,J.	Arch.Biochem. 11 , (1965) 559
42 Toft,D.,Gorski,J.	Proc.Nat.Acad.Sci. (USA) 55, (1966) 1574
43 Sweat,M.L.,Bryson,M.J., Young,R.B.	Endocrinology 81, (1967) 167
44 Breuer,H.,Dahm,K. Schmähl,D.	Naturwissenschaften 53, (1966) 203
45 Ahlers,B.	Dissertation FU Berlin Fachb.Pharm.,unveröff.
46 Hieronimus,B.	Dissertation FU Berlin Fachb.Pharm. Juli 1971
47 Karlson,P.,Sekeris,C.E.	Acta Endocrinol. 53, (1966) 505-518
48 Jensen,E.V.,Jacobson,H.J.	Biological activities of steroids in relation to cancer,Acad.Press N.Y./Lond. (1960) 161-178
49 Puca,G.A.,Bresciani,F.	Nature 218, (1968) 967-969
50 Roy,S.,Mahesh,V.B. Greenblatt,R.B.	Acta Endocrinol. 47, (1964) 645

51 Wyss,R.H.,Karsznia,R. LeRoy-Heinrichs,W. Herrmann,W.L.	J.Clin.Endocrin.Metab. 28, (1968) 1824-1828
52 King,R.J.B.,Cowan,D.M. Imman,D.R.	J.Endocrin. 32, (1965) 83-90
53 Mobbs,B.G.	J.Endocrin. 36, (1966) 409-414
54 Jungblut,P.W.,de Sombre, E.R.,Jensen,E.V.	Ab.Dtsch.Akad.Wiss.Berlin,kl.Med. 1, (1967) 109-122
55 Terenius,L.	Cancer Res. 28, (1968) 328-337
56 Schmidt,H.,Noack,I. Walter,H.,Voigt,K.D.	Acta Endocrinol. 56, (1967) 231-243
57 Martin,L.	Excerpta Medica Intern.Congr. series n.132 Proceedings of the second int.congr.on Horm.Ster. Milan, (1966)
58 Karlson,P.	Lehrbuch der Biochemie 6.Aufl.(1967) Thieme Verl.Stutt.
59 Stone,G.M.,Martin,C.	Steroids 3, (1964) 705
60 Wenzel,M.,Pollow,K.	Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 348, (1967) 1667
61 Wenzel,M.,Kleucker,H., Schulze,P.E.	Z.Naturfschg. 21b, (1966) 1178
62 Korenman,S.G.	Steroids 13, (1969) 163-177
62a Brecher,P.J.,Wotiz,H.H.	Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 128, (1968) 470-473
63 Vonderhaar,B.,Mueller,G.C.	Biochim.Biophys.Acta 176, (1969) 626-631
64 Velardo,J.T.	Hormonal Steroids,Biochem., Pharmacol.and Therap.Vol.1 (1964) Acad.Press N.Y.,Lon.463ff.
65 Lerner,L.J.	Recent Progr.in Hormone Res. XX, (1964) 435-490

66	Terenius,L.	Acta Endocrinol. 66, (1971) 442
67	Bialy,Merriell, Pincus,G.	Endocrinology 79, (1966) 125-130
68	Jensen,E.V.,Jacobson,H.J., Flesher,J.W.,Neumann,H.G., DeSombre,E.R.,Jungblut,P.W.	Steroid Dynamics ed.T.Nakao, G.Pincus,J.Tait 133-57 N.Y.Acadamic Press (1966)
69	Terenius,L.	Acta Endocrinol. 57, (1968) 669-682
70	King,R.J.B., Gordon,J.	J.Endocrin. 34,(1966) 431-437
71	Westphal,U.	in:Mechanisms of action of steroid hormones N.Y.Perg.Press (1961) 33
72	Terenius,L.	Cancer Res. 30, (1970) 692-698
73	Bloom,H.J.G.,Koe,F.J.C., Mitchley,B.C.V.	Cancer (Philad.) 20, (1967) 2118
74	Jensen,E.V.	Cancer Therapy, NCI Monograph. 34, (1971)
75	Wenzel,M.	Hoppe Seyler'sZ.physiol.Chem. 352, (1971) 1725-26
76	Jensen,E.V.,Hurst,D.J., DeSombre,E.R., Jungblut,P.	Science 158, (1967) 385-387
77	Terenius,L.	Steroids (March 1969) 311-25
78	Allen,E.,Doisy,E.A.	J.Americ.Med.Ass. 81, (1923) 819
79	Dorfman,R.J.u.A.S. Kingold,H.J.	Endocrinology 68, (1961) 17
80	Kessler,W.B.,Borman,A.	Ann.N.Y.Acad.Sci. 71, (1966) 486
81	Neumann,F.	in: Anabolikum Kolloqu. Medicus Verl. Berlin (1964) 8-11
82	Wenzel,M.,Mützel.W.	Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 352, (1971) 304-308

83	Wenzel,M.,Wolf,S.	Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 350, (1969) 1203
84	Wenzel,M.	Acta Endorinol. 67, (1971) 517-530
85	De Hertogh,R.	Acta Endocrinol. 66, (1971) 401
86	Wenzel,M.,Bollert,B.	Pharm.Inst.Berlin Isotopenabt. (1973) unveröff.
87	Martin,L.	J.Endocrinol. 30, (1964) 337
88	Jungblut,P.W.	Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 352, (1971) 1603-1610
89	Bitensky,M.W.,Tielding, K.L.,Tomkins,G.M.	J.Biol.Chem. 240, (1965) 668
90	Dellwig,H.	Dtsch.med.Wschr. 91, (1966) 1697
91	Folca,P.J.,Glascock,R.F., Irvine,W.T.	Lancet II (1961) 796-98
92	Brausberg,H., Irvine,W.T., James,V.H.	Brit.J.Cancer 21, (1967) 714-26
93	Jensen,E.V.,Block,G.E., Smith,S,Kyser,K.A., DeSombre,E.R.	"Hormone receptors and their role in the control of mammary tumour growth".3.Int.Symp.on the biol. charact. of hum.tumours,Madr.1969
94	Huggins,C.,Grand,L., Brillantes,F.P.	Nature, London 189, (1961) 204-207
95	Huggins,C.	Proc.Nat.Acad.Sci.,USA 51, (1964) 737-742
96	King RJ.B.,Gordon,J. Cowan,O.M.	J.Endocrin. 36, (1966) 139-150
97	Mobbs,B.G.	J.Endocrin. 41, (1968) 339-344
98	Jungblut,P.W.,DeSombre,E.R. Jensen,E.V.	in: Hormone in Genese u. Therapie des Mammakarzinoms (Gummel,H., Kraatz,H.,Bacigalupo,G.ed.Berlin) Akademie Verl.(1967) 109

99	Jensen,E.V.,DeSombre,E.R., Jungblut,P.W.	in: Endog.Factors infl.Host Tumour Balance (Wissler,R.W.,Dao, T.L.,Wood,S.Jr.eds.)Chicago,Univ. Chic.Press (1967) pp.15,68
100	Council on drugs	J.Amer.Med.Ass. 172, (1960) 1271
101	Nathanson,J.	Endocrinology of Neoplastic diseases,N.Y.,Oxford Univ.Press
102	Jolles,B.	Brit.J.Cancer 16, (1962) 209
103	Stoll,B.A.	Med.J.Australia I, (1966) 331
104	Labhart,A.	Schweiz.med.Wschr. 96, (1966) 807
105	McKenna,I.,Norymberski, J.K.,Stubbs,R.D.	J.Chem.Soc. Jul./Aug.1959, 2502-2509
106	Norymberski,J.K.	Unit for Endocrine Chemistry Depart.of Zool.,Sheffield Univ. (1972) persönl.Mitteilung
107	Curtis,R.G.,Heilbron,J., Jones,E.R.H.,Woods,G.F.	J.Chem.Soc. (1953) 461
108	Caglioti,L.,Cainelli,G., Maina,G.,Selva,A.	Tetrahedron Perg.Press N.Ireland 20, (1964) 957-61
109	Djerassi,C.	Tetrahedron Letters 46, (1972) 4673-75
110	Wiechert,R.,Rosenberg, Prezewowsky	Schering AG, Berlin persönl. Mitteilung
111	Wright,R.S.	J.Chromatogr. 59, (1971) 220-221
112	Pace,N.,Rathbun,E.	J.Biol.Chem. 158, (1945) 667
113	Cohrs,P.,Jaffé,R., Meessen,H.	in:Pathologie d.Laboratoriums-tiere,Springer Ver.(1958)
114	Zarrow,M.X.,Yochim,J.M., McCarthy,J.L.	Exp.Endocrinol.Acad.Press,N.Y.-Lond. (1964)
115	Wenzel,M.	Arzneimittelfschg. 18, (1968) 1176-1180

116 Wenzel,M.,Schulze,P.E. Tritium-Markierung,Verlag de Gruyter & Co,Berlin 1962

117 Breuer,H. Hoppe Seyler Thierfelder Handb.f.pathol.physiol.Chemie 10.Aufl. VI A (1963) 423ff.

LEBENSLAUF

Am 25.8.1942 wurde ich als drittes Kind des Apothekers Dr. Friedrich Goedecke und seiner Ehefrau Barbara, geb. Schmidt, in Solingen-Gräfrath geboren.

Nach der vierjährigen Volksschulzeit in Solingen-Gräfrath besuchte ich das Gymnasium Schwertstraße in Solingen. Nach einem Schulwechsel bestand ich im Februar 1963 die Reifeprüfung am Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium in Remscheid.

Von April 1963 bis März 1965 absolvierte ich meinen Militärdienst.

Von April 1965 bis März 1967 verbrachte ich meine Praktikantenzeit in der Mannsfeld-Apotheke in Köln. Vor dem Kölner Prüfungsausschuß bestand ich im März 1967 das pharmazeutische Vorexamen.

Nach einer halbjährigen Tätigkeit in der Goedecke'schen Apotheke in Solingen-Gräfrath begann ich im Oktober 1967 das Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin. Im Oktober 1970 bestand ich vor dem Prüfungsausschuß in Berlin das pharmazeutische Staatsexamen.

Im Anschluß an meine halbjährige Tätigkeit als Kandidat der Pharmazie in der väterlichen Apotheke begann ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Wenzel mit der Promotionsarbeit.

Im November 1972 schloß ich die Ehe mit der Kandidatin der Medizin Brigitte Longère.